

Wirkung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie
auf parodontopathogene Bakterien der Mundhöhle

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Markus Rentzsch

geboren am 14.01.1980

in Plauen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. Bernd W. Sigusch, Jena
2. Prof. Dr. Eicke Glockmann, Jena
3. Prof. Dr. Volker Albrecht, Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.05.2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Abkürzungsverzeichnis	5
1.1 Zusammenfassung	6
2 Einleitung	8
2.1 Pathogenese der Parodontalerkrankungen	8
2.2 Parodontologische Therapiekonzepte	10
3 Photodynamisches Therapieprinzip	12
4 Antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) als aktuelles Verfahren zur Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen	17
5 Ziele der Arbeit	20
6 Material und Methoden	21
6.1 Probanden	21
6.2 Studiendesign	22
6.3 Durchführung der aPDT mit dem Photosensitizer BLC 2003 Gel in Kombination mit dem Ceralas G2 Diodenlaser	23
6.4 Mikrobiologische Untersuchungen	26
6.4.1 Probenentnahme	26
6.4.2 Gesamtkeimzahl (GKZ)	27
6.4.3 Bestimmung der qualitativen und quantitativen Bakterien - DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion	28
7 Statistische Auswertung	33

	Seite
8	Ergebnisse
8.1	Einfluss der aPDT mittels BLC 2003 Gel auf die Gesamtkeimzahl (GKZ)
8.2	Veränderung der DNA-Konzentration der verschiedenen parodontalpathogenen Bakterienspezies durch aPDT mittels BLC 2003 Gel
8.2.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
8.2.2	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
8.2.3	<i>Tannerella forsythia</i>
9	Diskussion
10	Schlussfolgerungen
11	Literaturverzeichnis
12	Ehrenwörtliche Erklärung
13	Danksagung

1 Abkürzungsverzeichnis

LCP	Lokalisierte chronische Parodontitis
aPDT	antimikrobielle Photodynamische Therapie
PDT	Photodynamische Therapie
PS	Photosensibilisatoren
BnS	Blutung nach Sondierung
PI	Plaqueindex
ST	Sondierungstiefe
AL	Attachementlevel
GKZ	Gesamtkeimzahl
F.n.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
A.a.	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
P.g.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
T.f.	<i>Tannerella forsythia</i>
T.d.	<i>Treponema denticola</i>
qPCR	quantitative Polymerase - Kettenreaktion
PCR	Polymerase – Kettenreaktion
KbE/ml	Kolonie bildende Einheiten pro Milliliter
pg/ml	Picogramm pro Milliliter ($1/10^{12}$ g/ml)
TNF	Tumornekrosefaktor
IL-1	Interleukin -1
SRP	Scaling und Wurzelglätten
GTR	Gesteuerte Geweberegeneration
CHX	Chlorhexamed
GBR	Gesteuerte Knochenregeneration
PZR	Professionelle Zahnreinigung
PACT	Photoaktivierte Chemotherapie

1.1 Zusammenfassung

Der Einsatz der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (aPDT) zur Suppression parodontalpathogener Bakterien bei Patienten mit entzündlichen Parodontalerkrankungen basiert auf der Anwendung von Licht geeigneter Wellenlänge und entsprechenden Photosensibilisatoren (PS). In der vorliegenden In-vivo-Studie wurde die Anwendung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie als eine alternative Behandlungsmethode bei Parodontitispatienten getestet.

Nach positivem Votum der Ethikkommission der Universität Jena wurden für die mikrobiologischen Untersuchungen 39 Probanden mit lokalisierter chronischer Parodontitis (LCP) konsekutiv rekrutiert. Die Einteilung der Patienten erfolgte per Losverfahren in eine Testgruppe (n=20) und eine Kontrollgruppe (n=19).

Zur Ausgangsuntersuchung (Baseline), nach sorgfältiger professioneller Zahnreinigung durch eine Fachschwester für Zahn- und Mundhygiene, erfolgte bei allen Patienten die Ermittlung der Gesamtkeimzahl (GKZ) bzw. der Nachweis der parodontalpathogenen Spezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* mittels qualitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für die mikrobiologische Untersuchung wurden jeweils 2 endodontische Papierspitzen (ISO 30) für 10s in die tiefste parodontale Stelle pro Quadrant im Ober- und Unterkiefer eingebracht und Plaqueproben entnommen. Die PCR-Analyse hinsichtlich der quantitativen DNA-Konzentration erfolgte für die drei Bakterienspezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* mit Hilfe der sogenannten kompetitiven qPCR.

Dazu wurde eine bekannte Konzentration einer spezifischen Kompetitor-DNA und die gesuchte DNA als Template in einem PCR-Ansatz amplifiziert. Durch die schrittweise dekadische Verdünnung der bekannten Ausgangskonzentration der Kompetitor-DNA und dem Vergleich der im Agarosegel entstandenen Banden von Kompetitor- und Templateamplifikat erfolgte die Quantifizierung der Bakterien-DNA.

Die antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) mit dem Photosensitizer BLC 2003 Gel erfolgte nach konventioneller Therapie an drei aufeinander folgenden Tagen als Mundgesamtbehandlung mit dem System der Biolitec AG (Diodenlaser 532 nm, SN 0730 Applik., Photosensitizer BLC 2003-Gel, 1min pro Zahn, 0,25 W Ausgangsleistung) bei den Probanden der Testgruppe. Bei den Patienten der Kontrollgruppe wurde nur das Photosensitizer BLC 2003 Gel appliziert, ohne dass eine Laseranwendung folgte.

Zu vier posttherapeutischen Untersuchungszeitpunkten (nach 1xPDT, nach 3xPDT, 4 Wochen nach PDT, 3 Monate nach PDT) wurden bei allen Probanden (n=39) die mikrobiologischen Befunde erhoben und mit den Ausgangswerten verglichen.

Für die nachgewiesenen parodontalpathogenen Bakterienspezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* konnte die DNA-Konzentration nach einmaliger Photodynamischer Therapie (1xPDT) in der Testgruppe bereits signifikant um 72 – 85 % reduziert werden. Nach dreimaliger Anwendung der aPDT (3xPDT) in der Testgruppe war die DNA-Konzentration für die o. g. Bakterienspezies im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung fast vollständig supprimiert (86 - 98%; $p < 0,001$).

In der Kontrollgruppe ohne PDT blieb die DNA-Menge der drei Bakterienspezies zu allen Nachuntersuchungen im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung annähernd konstant.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der adjuvante Einsatz der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (aPDT) mit dem Photosensitizer BLC 2003 Gel nach konventioneller Therapie (SRP) zur deutlichen Suppression der parodontalpathogenen Bakterienspezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* führt.

2 Einleitung

2.1 Pathogenese der Parodontalerkrankungen

Die Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates und inzwischen auch ein nachgewiesener, ernst zu nehmender allgemeinmedizinischer Risikofaktor. Neben der Karies ist die Parodontitis die häufigste Ursache für Zahnverlust im Erwachsenenalter (Elter et al. 2004, Martin et al. 2009).

Man geht davon aus, dass die Biofilme, die so genannten weichen Plaqueanlagerungen, aber auch die mineralisierten Zahnbeläge, wie Zahnstein und Konkreme, den wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung der entzündlichen Parodontalerkrankungen darstellen (Albandar u. Rams 2002, Kocher et al. 2005). Auch das Rauchen und Diabetes mellitus (Nishimura et al. 1998, Lalla et al. 2000) sowie bestimmte Lebensgewohnheiten (Meisel et al. 2003) sind als äthiologische Faktoren zu nennen.

Es wird auch beschrieben, dass verschiedene Viren, zum Beispiel Herpesviren, zu einem erhöhten Parodontitisrisiko führen können und möglicherweise die subgingivale Besiedelung mit parodontalpathogenen Spezies fördern können (Contreras et al. 1999, Sigusch et al. 2006).

Eine chronische Parodontitis mit entsprechenden oralen Entzündungsherden und häufigen Bakteriämien kann auch mit systemischen Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Lungenerkrankungen assoziiert sein (Beck et al. 2000, Garcia et al. 2001, Dave et al. 2005). So sollen Parodontitiden beispielsweise auch die Artherosklerose und auch thrombotische Komplikationen fördern. Es ist möglich, dass Gerinnungsfaktoren und insgesamt das zelluläre und humorale Gerinnungssystem durch Gingipain der Bakterienspezies *Porphyromonas gingivalis* aktiviert werden (Brodalla et al. 2005).

Bei der Entstehung von pathologischen Entzündungsprozessen des Parodonts spielen spezielle Mikroorganismen eine wesentliche Rolle. Zu den wichtigsten Spezies gehören *Porphyromonas gingivalis* (Kömerik et al. 2003), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* sp. , *Eikenella*

corrodens, *Prevotella intermedia* und *Camphylobacter rectus* (Slots und Rams 1992). Aber auch Fusobakterien wie *F. nucleatum* als frühbesiedelnde Spezies, sind später in Läsionen bei chronischen und auch aggressiven Parodontitiden nachweisbar (van Winkelhoff et al. 2002).

Bei der Besiedelung kommt es zur Anlagerung der Bakterien an der vorgebildeten Pellikelschicht mit einer sich anschließenden Vermehrung und der Bildung von Biofilmschichten. Dieser so entstehende Biofilm ist in der Lage, sich den jeweiligen oralen ökologischen Nischen anzupassen. Für einzelne Mikroorganismen ist es möglich, sich mit ihrer Stoffwechsellumstellung von aerob auf anaerobe Verhältnisse zu adaptieren.

Von den proteolytischen Bakterien wie beispielsweise *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* werden Proteasen gebildet, die die Zerstörung des umliegenden Gewebes und des Zahnhalteapparates beschleunigen können (Nishihara und Koseki 2004). Trotz Aktivierung des Immunsystems sind einige Spezies wie *A. actinomycetemcomitans* in der Lage, z. B. durch Produktion von Leukotoxin, sich der Wirtsabwehr teilweise zu entziehen (Meyer et al. 1991, Blix et al. 1992).

Außerdem wird die lokale Immunabwehr insgesamt durch den Bakterienkontakt angeregt, bestimmte Zytokine, wie Tumornekrosefaktor und Interleukin-1 (IL-1), zu produzieren bzw. sogar über zu produzieren und damit Einfluss auf die Steuerung der ablaufenden Prozesse zu nehmen (Graves u. Chochran 2003). Diese beiden genannten Zytokine dienen der Aktivierung der Entzündungsreaktionen, unter anderem auch der körpereigenen Matrixmetalloproteinase. Diese können zum Gewebsverlust führen.

Tumornekrosefaktor wirkt sich negativ auf gingivale bzw. parodontale Fibroblasten aus, indem die Apoptose in den Bindegewebszellen gefördert und so der Zelluntergang beschleunigt werden kann. Durch die ablaufenden Entzündungsprozesse werden schließlich auch Osteoklasten aktiviert und somit ein Knochenabbau induziert.

Bei fehlendem therapeutischem Vorgehen kommt es zwangsläufig zu einem Fortschreiten der parodontalen Destruktion und somit letztlich zum Zahnverlust. Eine regelmäßige und gute orale Mundhygiene, durch die Zahnbeläge entfernt und dabei auch pathologische Mikroorganismen

reduziert werden können, führt zur Vermeidung von Parodontopathien (Lopez et al. 2001).

2.2 Parodontologische Therapiekonzepte

Die Parodontaltherapie dient im Wesentlichen dazu, die klinischen Parameter wie Rötung, Blutung, Plaque und Sondierungstiefen zu reduzieren und die parodontalpathogenen Bakterienspezies ausreichend zu supprimieren. Ziele sind die Regeneration parodontaler Strukturen und auch ein dauerhaft entzündungsfreier Zustand des Parodonts.

Der erste Behandlungsschritt erfolgt durch dentales Fachpersonal mit sorgfältigem Scaling und Wurzelglätten (SRP) und anschließender Politur der Zahnoberflächen. Dabei werden supra- und subgingivale Plaque- und Zahnsteinanlagerungen möglichst vollständig entfernt. Nach einem Zeitintervall von ca. drei bis vier Wochen wird das erweiterte Glätten der Wurzeloberflächen in einem zweiten Schritt als Mundgesamtbehandlung unter lokaler Anästhesie durchgeführt (Sigusch et al. 2001). Maßgebend für eine erfolgreiche Therapie ist die Beseitigung der Entzündung, die Reduktion der Sondierungstiefen, die Verbesserung des Attachementniveaus und die Vermeidung von Zahnverlusten (Lindhe und Nyman 1987, van der Velden und Schoo 1999).

Nach Entfernung der subgingivalen Konkreme ist bereits mit einer Verbesserung der klinischen Befunde zu rechnen (Dahlen et al. 1992). Häufig jedoch führt die mechanische Therapie allein nicht zur dauerhaften Suppression der parodontalpathogenen Spezies (Slots et al. 1986, Mombelli et al. 1994, Müller et al. 1995, Sigusch et al. 2000).

Ist dann zusätzlich eine chirurgisch-korrektive Behandlung notwendig, können die geschlossene bzw. offene Kürrettage durchgeführt werden. Auch die modifizierte Lappenoperation nach Widman (Weber 1997) sowie regenerative Therapieverfahren, wie die gesteuerte Geweberegeneration (GTR), können zur Anwendung kommen (Loesche und Grossman 2001). Aber auch die chirurgischen Verfahren führen selten zur ausreichenden Suppression der parodontalpathogenen Bakterien (Sigusch et al. 2001).

Allerdings kann der adjuvante systemische Einsatz von Antibiotika zur Unterstützung der mechanischen Therapie zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Langzeitergebnisse führen (Sigusch et al. 2001, Slots 2002). Vor der Applikation der Antibiotika muss zunächst eine akribische mechanische Beseitigung der Biofilme erfolgen, um die Effektivität der Antibiose zu garantieren (Slots und Jorgensen 2002, Sigusch et al. 2005). Andere Studien belegen gute Langzeitergebnisse in der Parodontaltherapie bei der adjuvanten Gabe von Antibiotika, wie beispielsweise dem Metronidazol, Clindamycin, Tetrazyklin und Amoxicillin (Flemming et al. 1998, Sigusch et al. 2001).

Dennoch wird eine routinemäßige Anwendung von Antibiotika keinesfalls empfohlen (Bollen und Quirynen 1996). Ein Grund ist die Entstehung von resistenten Bakterienstämmen (Walker 1996, Eick et al. 1998, Eick et al. 2000, van Winkelhoff et al. 2000, Roberts 2002). Es können aber auch Unverträglichkeitsreaktionen bis hin zu Sensibilisierung auftreten und daraus manifeste Allergien entstehen.

Lokale Antiseptika, wie beispielsweise das Chlorhexidin (CHX), werden zur chemischen Plaquebeeinflussung eingesetzt (Addy 1999, Wu und Savitt 2002) und können die antientzündliche Therapie unterstützen (Dubrez 1989, Sanz et al. 1989, Oosterwaal et al. 1991). Aber auch bei der Anwendung oraler Desinfizienzen, wie dem Chlorhexidin und zinnfluoridhaltigen Lösungen (Meridol) sind Nebenwirkungen wie reversible Verfärbungen an den Zähnen, verstärkte Zahnsteinbildung und Geschmacksirritationen nicht auszuschließen (Ochsenbein 1974, Plagmann 1998a). Aus diesem Grund sollte der langfristige Einsatz lokaler Antiseptika vermieden werden.

Die antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) als modernes Therapieverfahren zur Behandlung entzündlicher Parodontalerkrankungen könnte durch die Suppression von parodontalpathogenen Spezies (Komerik et al. 2003, Pfitzner et al. 2004) auch die Wirksamkeit der chemischen Plaquekontrolle steigern. Aufgrund von fehlenden Nebenwirkungen (Soukos et al. 1998) besteht die Möglichkeit, dieses Verfahren in Verbindung mit mechanischer Plaque- und Konkremententfernung adjuvant einzusetzen. Auf die Mechanismen der PDT-Methodik soll im nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

3 Photodynamisches Therapieprinzip

Das Prinzip der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (aPDT) beruht auf photochemischen Reaktionen, die durch eine Kombination von Licht und lichtsensitiven Substanzen, sogenannten Photosensitizern oder Photosensibilisatoren hervorgerufen werden (Pass 1993). Diese binden an die bakterielle Zellwand und werden mit Licht geeigneter Wellenlänge aktiviert. Die dabei entstehenden freien Radikale und Singulett - Sauerstoff haben eine toxische Wirkung auf die Zielzelle bzw. das Bakterium (Landthaler et al 1993, Pass 1993).

Die Photodynamische Therapie basiert auf Untersuchungen des Medizinstudenten Oskar Raab aus dem Jahre 1900. Dieser war ein Schüler des Münchner Professors Herrmann von Tappeiner und beobachtete, dass es im Rahmen der Interaktion des Farbstoffs Acridin mit Licht unter Anwesenheit von Sauerstoff zur Abtötung von Paramezien (Pantoffeltierchen) kommt (Pass 1993).

1903 führten H. von Tappeiner und A. Jesionek erste Behandlungsversuche mit Eosin als photoaktive Substanz bei Hautkrebs, Lupus vulgaris und genitalen Kondylomen durch (von Tappeiner und Jesionek 1903). Im Jahre 1907 wurde dann von Tappeiner erstmals die Bezeichnung „Photodynamische Therapie“ eingeführt (von Tappeiner und Jodlbauer 1907).

1911 entdeckten sowohl W. Hausmann, als auch H. Pfeiffer durch experimentelle Untersuchungen die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. Die daraufhin entwickelten Photosensibilisatoren, beruhend auf der Porphyringrundlage (Pass 1993), haben meist zahlreiche alternierende Kohlenstoffdoppelbindungen und somit π -Elektronensysteme. Aufgrund verschiedener Orientierungsmöglichkeiten der Elektronen in einem Magnetfeld können diese im Singulett-, Duplett- oder Triplettzustand vorliegen (Czihak et al. 1992) und sind ihrerseits in Schwingungsniveaus gesplittet.

Die Photonenabsorption des Lichtes hebt die delokalisierten π -Elektronen auf energiereichere Orbitale um den Atomkern. Dadurch geht der Photosensitizer von seinem Grundzustand S0 in den angeregten Singulett-Zustand S1 über, welcher mit einer Halbwertszeit von 10^{-9} s langlebig genug ist, um mehrere Energie umwandelnde Prozesse auszulösen (Schopfer und Brennicke 1999).

Die verschiedenen Photosensitizer besitzen durch ihre unterschiedliche Struktur und ihren Wechselwirkungen mit dem entsprechenden Lösungsmittel verschiedene Absorptionsmaxima. Die Maxima reichen von 300 nm bei Psoralen bis zu 700 nm bei makrozyklischen Photosensitizern (Wainwright 1998). Energetisch am günstigsten ist dabei die Anregung im Absorptionsmaximum. Da die durch die Strahlung angeregten Elektronen bestrebt sind, wieder in den stabilen Grundzustand S0 zurückzukehren, wird die aufgenommene Energie wieder abgegeben. Beim Übergang des angeregten Photosensibilisators vom Singulettzustand zurück in den Grundzustand kann sie dann in Form von Wärme oder Licht (als Fluoreszenzstrahlung) abgegeben werden. Durch strahlungslose Relaxation (IC – „internal conversion“) gelangt das Molekül unter teilweiser Abgabe der aufgenommenen Energie zunächst auf das niedrigste Schwingungsniveau des S1-Zustandes. Dieses wird auch als LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) bezeichnet.

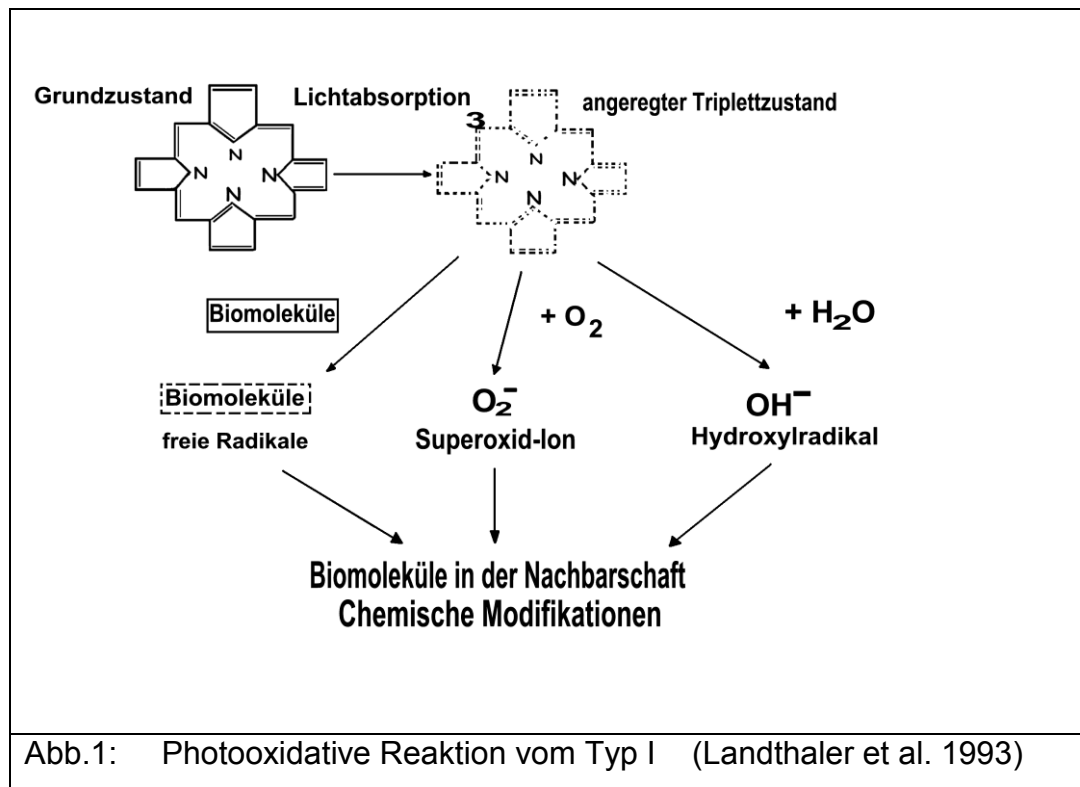
Bei der Rückkehr aus diesem Zustand in den Grundzustand S0 wird die restliche Energie über verschiedene intramolekulare Prozesse abgegeben. Der intramolekulare Weg wird dabei durch die Struktur des jeweiligen Moleküls bestimmt. Neben der Möglichkeit der strahlungslosen isoenergetischen Umwandlung, bei der die Energie in Schwingungsenergie (Wärme) umgewandelt wird, kann die frei werdende Energie auch als Licht emittiert werden (Fluoreszenzstrahlung). Desweiteren kann der Photosensitizer aus seinem angeregten S1-Zustand auch nicht strahlungsemitierend in den langlebigeren T1-Zustand übergehen (Laustriat 1986). Bei der Fluoreszenz wird die Energie in Form eines Photons typischerweise beim Übergang vom energieärmsten Schwingungsniveau des ersten angeregten Energiezustandes S1 eines Moleküls in ein Schwingungsniveau des Grundzustandes S0 abgegeben.

Durch Intersystem Crossing (ISC) kann auch der Übergang in den oben genannten metastabilen Triplett-Zustand T1, welcher den Ausgangszustand für photochemische Reaktionen vom Typ I („charge-transfer“) und Typ II („energy-Transfer“) darstellt, erfolgen. Hierbei findet ein isoenergetischer Übergang mit Elektronen-Spinumkehr in den schwingungsangeregten Triplett-Zustand statt.

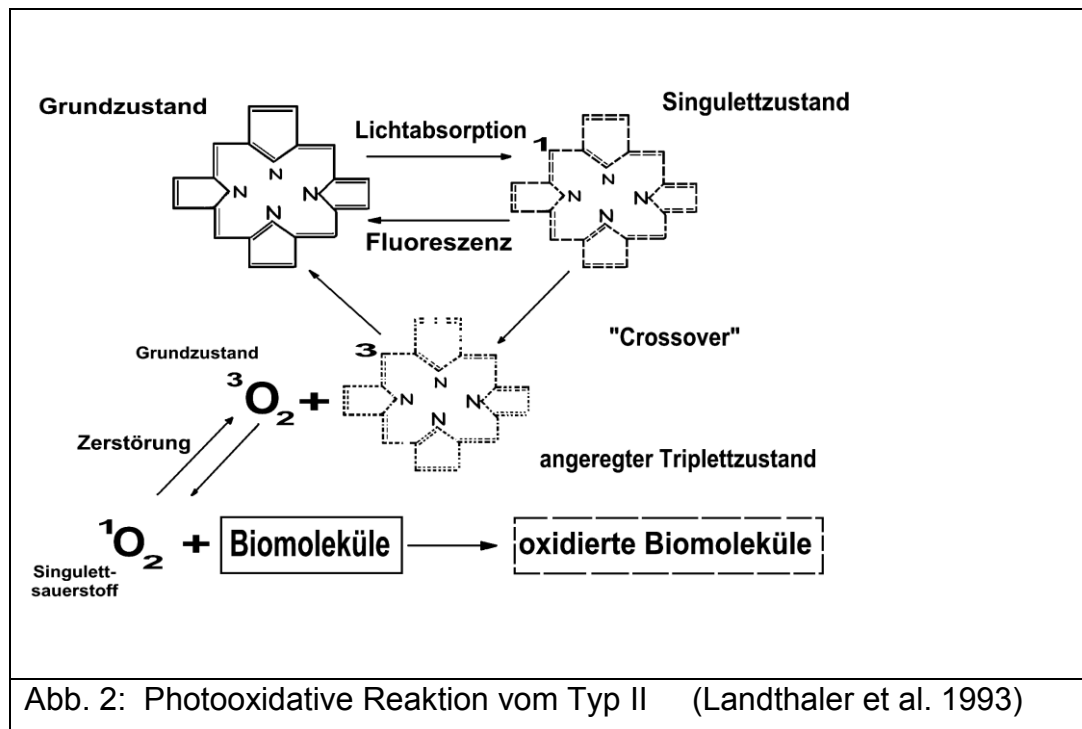
Mögliche Übergänge vom Triplett-Zustand in den Grundzustand S0 stellen die Phosphoreszenz, Interkombination in einen hochangeregten S0 Zustand, verzögerte Fluoreszenz, sowie chemische Reaktionen dar. Der Übergang vom Triplett-Zustand in den Grundzustand (=Phosphoreszenz) ist mit einer erneuten Spinumkehr verbunden. Diese ist nur relativ langsam möglich und macht damit den Triplett-Zustand langlebiger als den S1-Zustand, wodurch auch biomolekulare Reaktionen ermöglicht werden (Stohrer 1998). Sie garantieren die Energieübertragung vom erregten Photosensitizer auf andere Moleküle.

Die für die biologische Wirkung der Photosensitizer wichtigen photochemischen Reaktionen lassen sich in verschiedene Typen einteilen (Malik et al. 1990, Dougherty et al. 1998, Oleinick und Evans 1998, Wainwright 1998, Wöhrle 1998a).

Die Reaktionen vom Typ I und Typ II bedingen die Zytotoxizität der PDT. Sie besitzen photooxidativen Charakter, das heißt, dass sie auf das Vorhandensein von Sauerstoff angewiesen sind. Vieles deutet darauf hin, dass die Produktion von Singulett-Sauerstoff im Rahmen der Typ II-Reaktion die Basis für die Zytotoxizität der aPDT darstellt (Moan 1990). Bei Reaktionen des Typ I (Abb. 1) kommt es zur Reduktion von Sauerstoff unter Bildung von Superoxidradikalen. Als Ursache der Zellschädigung werden Redoxreaktionen und Radikalkettenreaktionen, die durch Elektronentransfer ausgelöst werden, diskutiert (Henderson 1992).



Bei der Reaktion vom Typ II (Abb. 2) entsteht durch Elektronenübertragung auf molekularen Triplett-Sauerstoff der Singulett-Sauerstoff. Dieser im Anschluss mit dem Gewebe reagierende Singulett-Sauerstoff ist hoch reaktiv und äußerst zytotoxisch gegenüber biologischen Molekülen (Moan 1990). Er ist in der Lage Aminosäuren, Nukleinsäuren, ungesättigte Fette und Fettsäuren zu oxidieren. Für die zytotoxische Wirkung der aPDT kann auch die Typ III Reaktion verantwortlich sein, die keinen Sauerstoff benötigt (Sibata et al. 2000), und meist bei im UV-Bereich absorbierenden Photosensibilisatoren auftritt. Bei dieser erfolgt der Elektronentransfer auf Triplett-Sauerstoff mit der Bildung von Superoxid-Anionen.



Die Reaktionen vom Typ I und II laufen während der aPDT nebeneinander ab. Die Art des Photosensitizers, des Gewebes, der Sauerstoffpartialdruck, sowie die Konzentration der photoaktiven Substanzen im Gewebe beeinflussen das Verhältnis der Reaktionen zueinander.

4 Antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) als aktuelles Verfahren zur Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen

Die Möglichkeit des adjuvanten Einsatzes der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie zur Suppression parodontalpathogener Bakterienspezies bei entzündlichen Parodontalerkrankungen gewinnt zunehmend an Bedeutung.

Einerseits führt die mechanische (Scaling und Wurzelglätten) und auch die chirurgisch-korrektive Parodontitistherapie nicht zu einer dauerhaften Suppression parodontopathogener Bakterien (Müller et al. 1995, Sigusch et al. 2000, Sigusch et al. 2003). Andererseits besteht bei häufiger adjuvanter Gabe von Antibiotika die Gefahr der Ausbildung resistenter Bakteriestämme (Walker und Karpinia 2002, Rodrigues et al. 2004, Jorgensen et al. 2005). Zudem kann auch die Anwendung von oralen Antiseptika und Antibiotika zu Störungen der Standortflora führen. Speziell diese Erkenntnisse haben dazu geführt, nach alternativen Behandlungsstrategien in der Parodontitistherapie zu suchen.

Konopka et al. begründeten 2007 in einer Studie aufgrund vermehrt auftretender antibiotikaresistenter Bakterienstämme die Notwendigkeit für alternative parodontologische Behandlungsmethoden, um Biofilme besser kontrollieren und parodontale Läsionen effektiver behandeln zu können. Bereits in dieser Untersuchung kam die antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) als ein alternatives Therapiekonzept am Patienten zum Einsatz.

Wainwright et al. beschrieben außerdem in einer Studie von 2004 die Wirksamkeit der aPDT gegenüber antibiotikaresistenten bzw. antibiotikasensitiven Bakterien. Eine Resistenzbildung seitens parodontalpathogener Spezies bezüglich der zytotoxischen Aktivität von Singulett-Sauerstoff bzw. freien Radikalen gilt als unwahrscheinlich.

In der Literatur liegen für den Einsatz der aPDT, insbesondere für die toxische Wirkung auf Bakterien, bereits unterschiedliche In-vitro-Studien vor (Haas et al. 1997, Soukos et al. 2003, Pfitzner et al. 2004). Diese In-vitro-Studien zeigen, dass verschiedene parodontalpathogene Bakterienspezies

wie *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* und *F. nucleatum* effizient durch die Photochemotherapie supprimiert werden können. Speziell die Verwendung des Photosensitizers Toluidin-Blau in Verbindung mit einem sogenannten He/Ne-Softlaser zeigte sich dabei als höchst effektiv (Dobson und Wilson 1992, Henry et al. 1995, Wilson et al. 1995, Haas et al. 1997, Kömerik et al. 2003). In anderen tierexperimentellen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass nach induzierter Parodontitis durch die Anwendung der aPDT und der daraus resultierenden Suppression von *P. gingivalis* eine zusätzliche Reduzierung des Knochenabbaus erreichbar ist (Kömerik et al. 2003, de Almeida et al. 2007).

Inzwischen sind auch zahlreiche Studien am Patienten zu finden, in denen über den Effekt der aPDT berichtet wird (Haas et al. 2000, Dörtbudak et al. 2001, Shibli et al. 2003, Shibli et al. 2006, Sigusch et al. 2007, Sigusch et al. 2010). Neben den verschiedenen Bakterienspezies können zusätzlich auch die klinischen Parameter wie Rötung, Blutung, Plaqueakkumulation und Sondierungstiefe mittels Photodynamischer Therapie deutlich reduziert werden (Sigusch et al. 2007, Christodoulides et al. 2008, Braun et al. 2008, Chondros et al. 2009).

Auch bei der Behandlung von Periimplantitis-Patienten findet die Photodynamische Therapie zunehmend Verwendung. Die bakterielle Besiedlung und Ausbildung von Biofilmen auf Implantatoberflächen führt zu entzündlichen Veränderungen an benachbarten Weichgeweben. Verschiedene Studien belegen auch hier die positiven Effekte der aPDT (Dörtbudak et al. 2001, Shibli et al. 2003, Hayek et al. 2005). Die Therapie der Periimplantitis mittels gesteuerter Knochenregeneration (GBR) in Verbindung mit der photoaktivierten Chemotherapie (PACT) ermöglicht beispielsweise eine noch bessere Re-Osseointegration als GBR allein (Shibli et al. 2006).

Es sind auch Literaturhinweise zu finden, wonach die aPDT erfolgreich zur Prävention der alveolären Ostitis und des Dolor post extractionem (Neugebauer et al. 2004), sowie zur Desinfektion von Wurzelkanälen (Williams et al. 2006, Garcez et al. 2007) angewendet wird.

Auch in anderen medizinischen Bereichen wie der Krebstherapie, findet die Photochemotherapie bei der Behandlung von z. B. Kopf- und

Nackenkarzinomen ihre Anwendung (Biel 2002, Allison et al. 2005, Biel 2006).

Die Kombination effektiver Photosensitizer mit entsprechenden Lichtquellen geeigneter Wellenlänge ermöglicht den klinischen Einsatz der aPDT speziell auch in der Parodontologie. Hinzu kommt, dass die Applikation des Sensitizers weitestgehend schmerzfrei erfolgt und bisher keine toxischen Effekte nachweisbar sind (Dörtbudak et al. 2001, Kömerik et al. 2003, De Oliveira et al. 2007). Durch die Interaktion von Singulett-Sauerstoff und freien Radikalen mit den Zellstrukturen und einer gleichbleibenden Wirkung sowohl gegenüber Antibiotika resistenten als auch empfindlichen Bakterien, kommt es trotz mehrfacher Anwendung nicht zu einer Ausbildung resistenter Bakterienstämme (Wainwright und Crossley 2004). Anhand der bereits vorliegenden klinischen Untersuchungen kann der Einsatz der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie eine alternative Methode zur Suppression parodontalpathogener Spezies darstellen. Es fehlen allerdings bisher kontrollierte Studien, um speziell die mikrobiologischen Effekte der aPDT beobachten zu können.

5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (aPDT) nach konventioneller PZR (Scaling und Wurzelglättung) als eine adjuvante Behandlungsmethode zur Suppression parodontalpathogener Spezies bei Parodontitispatienten getestet. Es kam der Photosensitizer BLC 2003 Gel in Verbindung mit dem Ceralas G2 Diodenlaser zum Einsatz.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- Beeinflusst der adjuvante Einsatz der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie das parodontale Bakterienspektrum?
- Welche Wirkung zeigt die antimikrobielle Photodynamische Therapie auf die parodontalpathogenen Bakterienspezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia*?
- Wie beeinflusst die mehrfache Anwendung der aPDT die Gesamtkeimzahl und die verschiedenen parodontalpathogenen Bakterienspezies?

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen Fragen nach dem adjuvanten Einsatz der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie als eine mögliche Behandlungsstrategie zur Suppression parodontalpathogener Spezies bei entzündlichen Parodontalerkrankungen beantworten.

6 Material und Methoden

6.1 Probanden

Nach positivem Votum der Ethikkommission der Universität Jena wurden für die vorliegende In-vivo-Studie 39 Patienten (13 Männer, 26 Frauen) aus dem Patientenpool der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn - Mund - und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Jena konsekutiv rekrutiert (Tab. 1). Alle Probanden (n=39) wiesen eine lokalisierte chronische Parodontitis (LCP) auf. Diese charakterisiert sich dadurch, dass weniger als 30% der gemessenen parodontalen Stellen eine Sondierungstiefe über 3,5 mm aufweisen (Armitage 1999).

Zwei Wochen vor Studienbeginn erfolgte zunächst bei allen ausgewählten Patienten (n=39) eine parodontale Vorbehandlung im Rahmen einer professionellen Zahnreinigung. Durch sorgfältiges supra- und subgingivales Scaling und Wurzelglätten durch eine Fachschwester für Zahn- und Mundhygiene wurden supragingivale Beläge und subgingivale Konkremente entfernt. Zusätzlich wurden anamnestisch die Lebensgewohnheiten eines jeden Patienten erfragt. Ausschlusskriterien waren Nikotin- bzw. Alkoholabusus, mangelnde Compliance sowie Antibiotikatherapie im Vorfeld der Studie. Nach zufälliger Auswahl im Losverfahren wurden anschließend jeweils 20 Personen der Testgruppe und 19 Personen der Kontrollgruppe zugeordnet.

Tab. 1: Demographische Daten der PDT-Gruppe und der Kontrollgruppe.

	PDT-Gruppe			Kontrollgruppe		
	weiblich	männlich	gesamt	weiblich	männlich	gesamt
Anzahl (n)	13	7	20	13	6	19
Durchschnittsalter (in Jahren)	53,8	47	51,4	57,8	55,8	57,2
Standardabweichung	13,24	12,08	12,95	8,91	6,15	8,02
Minimum (Alter)	22	29	22	44	49	44
Maximum (Alter)	76	63	76	76	65	76

6.2 Studiendesign

In beiden Gruppen begann die Durchführung der Studie zeitgleich. Bei der Ausgangsuntersuchung (Baseline) am ersten Tag wurden bei allen Patienten (n=39) die klinisch relevanten Parameter wie Plaqueindex (PI), Blutung nach Sondierung (BnS), Rötung, Sondierungstiefe (ST) sowie der Attachementlevel (AL) erfasst und in einem Befundbogen dokumentiert. Die Messung erfolgte mit Hilfe einer Millimeter-graduierten-Sonde an jeweils sechs Stellen pro Zahn.

Außerdem wurde die größte Sondierungstiefe pro Quadrant ermittelt. Aus diesen parodontalen Stellen wurden auch die Proben für die mikrobiologische Untersuchung entnommen (siehe Kapitel 6.4.1). Die Entnahmestellen blieben während der gesamten Studie für jeden Patienten gleich, d. h. die mikrobiologischen Proben wurden immer von der gleichen parodontalen Stelle pro Quadrant entnommen.

Die antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) wurde nach der Baseline-Ausgangsuntersuchung an drei aufeinander folgenden Tagen als Mundgesamtbehandlung bei den 20 Patienten der Testgruppe durchgeführt. Bei den Patienten der Kontrollgruppe (n=19) wurde nur das Photosensitizer BLC 2003 Gel appliziert, ohne dass eine Laseranwendung folgte. Die Probanden der Kontrollgruppe erhielten, wie auch die der Testgruppe, Mundhygieneinstruktionen durch eine Fachschwester für Zahn- und Mundhygiene. Diese beinhalteten beispielsweise zweimal tägliches Zähneputzen, sowie die regelmäßige Verwendung von Zahnseide und Interdentalraumbürstchen.

Für die mikrobiologische Untersuchung wurde zu definierten posttherapeutischen Untersuchungszeitpunkten sowohl in der Testgruppe als auch in der Kontrollgruppe Sulkusflüssigkeit aus den o. g. parodontalen Stellen entnommen und die ermittelten Daten im Rahmen der Auswertung mit dem Baseline – Ausgangswert verglichen (Abb. 3).

Die klinischen Parameter Plaqueindex (PI), Blutung nach Sondierung (BnS), Rötung, Sondierungstiefe (ST) sowie Attachementlevel (AL) wurden parallel zu den mikrobiologischen Untersuchungen erfasst. Die Veränderung der klinischen Parameter durch die aPDT wurde jedoch in einer separaten Untersuchung ausgewertet, weshalb in der vorliegenden Arbeit nicht näher darauf eingegangen wird.

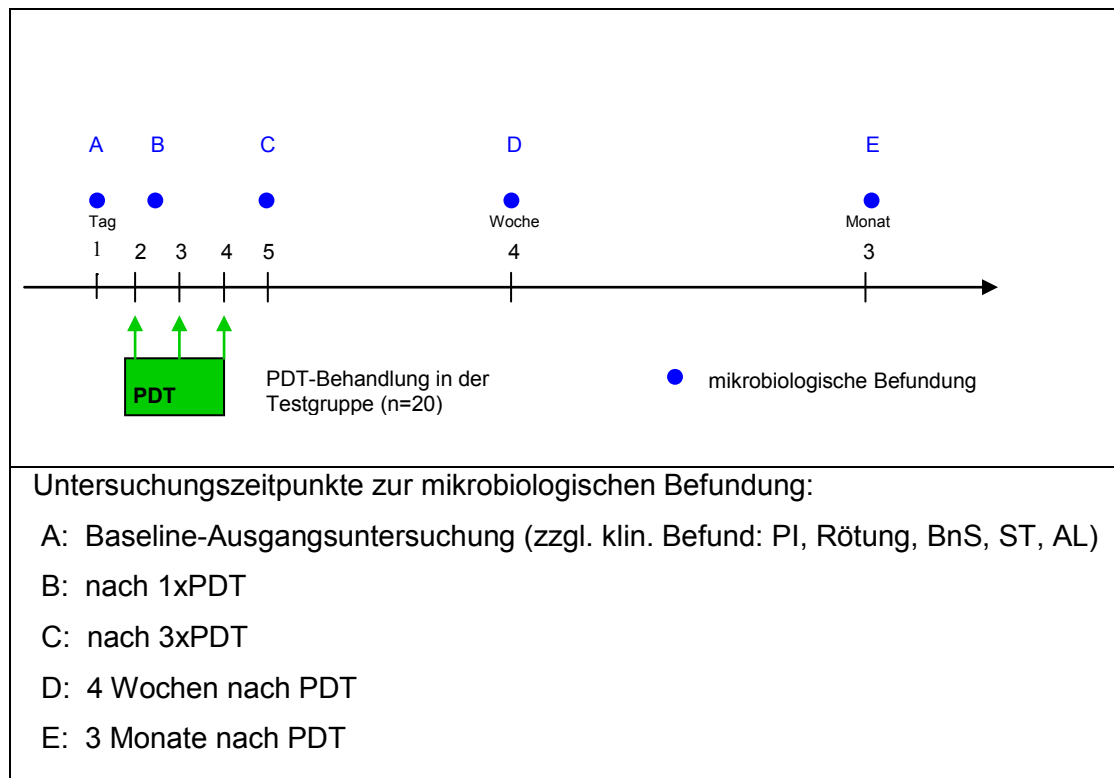


Abb. 3 : Schematischer Ablauf des Studiendesigns

6.3 Durchführung der aPDT mit dem Photosensitizer BLC 2003 in Kombination mit dem Ceralas G2 Diodenlaser

Als Photosensitizer kam BLC 2003 (Safranin O, Biolitec AG-Jena) zur Anwendung. Dabei handelte es sich um ein lipophiles Safraninderivat in Kombination mit Hydroxycellulose (4%) und Propylenglycol (10%). Dieser PS stand als rötlich-farbiges Gel in einer Konzentration von 5 mmol zur Verfügung.

Mit jeweils einer Fertigspritze pro Patient wurde bei den Probanden der Testgruppe (n=20) der Photosensitizer BLC 2003 Gel mit Hilfe einer stumpfen Kanüle in den Gingivasulkus bzw. die parodontale Tasche (Abb. 5) sowie auch auf den Zungenrücken appliziert.

Nach vollständiger Benetzung aller genannten Stellen betrug die Einwirkzeit 1 min, um das Anlagern des Photosensitizers an der Bakterienmembran zu ermöglichen. Nicht gebundenes Sensitizer-Gel wurde danach durch einen Spülschritt entfernt (Patienten spülten ihren Mundraum einmal mit klarem Wasser aus, Abb. 6).

Unmittelbar im Anschluss an diesen Spülschritt erfolgte die Photoaktivierung des Sensitizers durch den Ceralas Diodenlaser. Dieser hatte eine Wellenlänge von 532 nm bei einer Ausgangsleistung von 0,25 W (Abb. 4). Die Abgabe der Strahlung erfolgte nicht punktförmig sondern flächig über eine kegelförmige Lichtfaser (Durchmesser 0,4 mm; Abb. 7).

Der Sulkusbereich bzw. die Zahnfleischtaschen wurden an 6 Stellen pro Zahn für jeweils 10 Sekunden bestrahlt. Daraus ergab sich für jeden vorhandenen Zahn eine Gesamtbestrahlungszeit von etwa 1 Minute. Für die Bestrahlung des Zungenrückens teilten wir diese optisch in sechs Quadranten ein. Jeder Quadrant wurde für jeweils 10 Sekunden mit Hilfe der kegelförmigen Lichtfaser flächig bestrahlt. Somit ergab sich für die Zunge eine Gesamtbestrahlungszeit von etwa 1 Minute.



Abb. 4.: Ceralas G2 Diodenlaser, Ausgangsleistung 0,25 W Firma Ceram Optec GmbH, Bonn.



Abb. 5: Photosensitizer BLC 2003-Gel nach Applikation in alle parodontalen Stellen, Einwirkzeit: 1 min / Stelle.



Abb. 6: Zustand nach Entfernung des nicht gebundenen Photosensitizer-Gel durch einen Spülschritt mit klarem Wasser.



Abb. 7: Anwendung des Ceralas G2 Diodenlasers, Wellenlänge 532 nm/0,25W, 6 Stellen/Zahn, 10 Sekunden/Stelle.

6.4 Mikrobiologische Untersuchungen

6.4.1 Probenentnahme

Aus der jeweils größten, zur Ausgangsuntersuchung ermittelten parodontalen Stelle pro Quadrant, wurde mit Hilfe von sterilen endodontischen Papierspitzen (1 paper point pro Entnahmestelle, ISO 30) bei allen Probanden (n=39) Sulkusflüssigkeit entnommen. Für eine ausreichende Benetzung verblieben diese für 10 Sekunden in der parodontalen Tasche.

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in zwei Pools zu je 4 Papierspitzen in zwei Eppendorfgefäße gesplittet. Ein Probenpool diente zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ). Der zweite Pool wurde bei -20°C bis zur Bestimmung der qualitativen und quantitativen DNA-Konzentration mittels Polymerase – Kettenreaktion (PCR) aufbewahrt.

Alle weiteren mikrobiologischen Probenentnahmen der Test- und Kontrollgruppe zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten (Abb. 3) erfolgten an der gleichen Messstelle pro Quadrant, die zur Ausgangsuntersuchung ermittelt worden war. Die mikrobiologische Auswertung hinsichtlich der Gesamtkeimzahl (GKZ) und der qualitativen und quantitativen DNA-Konzentration der verschiedenen parodontalpathogenen Bakterien wurde im wissenschaftlichen Labor I der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde des Universitätsklinikums Jena durchgeführt.

6.4.2 Gesamtkeimzahl (GKZ)

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurden aus den nicht eingefrorenen Proben aller Probanden (n=39) Verdünnungsreihen (10^{-4} 10^{-6}) hergestellt. Dazu wurden die benetzten Papierspitzen im Eppendorfgefäß mittels

physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) befeuchtet, um die enthaltenen Bakterien in Lösung zu bringen. Daraus konnten dann, nach vorheriger Durchmischung der Proben mit einem Vortexmixer, die o. g. Verdünnungsreihen von 10^{-4} 10^{-6} erstellt werden.

Mit Hilfe eines Glasspatels erfolgte anschließend das Aufbringen auf Schaedler-Agar-Platten (Schafsblut, Vit. K). Diese Platten verblieben nun für 7-10 Tage unter anaeroben Bedingungen bei etwa 37°C im Brutschrank (MK3-Anaerob-Werkbank, Abb. 8). Nach Kultivierung und Entnahme aus der Anaerobierbox erfolgte die Auszählung der Kolonie bildenden Einheiten für die jeweiligen Untersuchungszeitpunkte (Abb. 3) beider Gruppen (Test-/Kontrollgruppe). Die ermittelten Daten wurden als Kolonie-bildende-Einheiten pro ml (KbE/ml) erfasst und dokumentiert.



Abb. 8: Anaerobierbox „MK3 Anaerobic Work Station“

6.4.3 Bestimmung der qualitativen und quantitativen Bakterien-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Um die qualitative bakterielle Besiedlung der parodontalen Taschen zu ermitteln, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zunächst als mikrobiologische Standardmethode angewendet. Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen und kann auch als Nachweis winziger DNA-Mengen dienen.

Bei dem Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion werden Genomabschnitte in mehrfach durchlaufenen Syntheseschritten (Denaturierung, Primer-Annealing, Extension) amplifiziert und anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. 16S rRNA-Gene sind in jedem Bakterium vorhanden und gehören zu den während der Evolution hoch konservierten Gensequenzen. Deshalb eignen sich diese Gensequenzen auch als Zielorte der Genamplifikation. Die 16S rRNA-Gene weisen Signalsequenzen auf, die für die einzelnen Bakterienarten spezifisch sind.

Die im Eppendorfröhrchen befindlichen, auf Zimmertemperatur aufgetauten, Papierspitzen wurden mit 100 µl Aqua destillata angelöst, gevortext und bei 99°C für 10 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben kurz anzenrifugiert, um alle Zelldebris aus der Lösung zu entfernen. Der Überstand (Template-DNA) konnte dann bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren werden.

Für den PCR-Ansatz wurden 2 µl der Template-DNA zu 48 µl eines Reaktionsgemisches (Mastermix) pipettiert, welches sich aus 5 µl 10xPCR-Puffer+15mM MgCl₂ (Promega, Madison, USA), 0,25 µl DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* „Taq-Polymerase“ (Promega), 1 µl einer Mischung aller Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPs: Adenin-, Guanin-, Cytocin-, Thymin-Triphosphat)), 0,25 µl des bakterienspezifischen 3'-Primers sowie des 5'-Primers und 41,25 µl Aqua destillata zusammengesetzt hat. Alle Lösungen und vorbereiteten PCR-Ansätze wurden bis zum Start der PCR gekühlt.

Die Amplifikation (Vermehrung) der Nukleinsäuresequenzen erfolgte im PCR-Thermocycler (Tpersonal Cyclor, Biometra, Deutschland). Die Reaktionsansätze wurden einem Temperaturregime unterzogen, welches mit einer Denaturierung der DNA-Doppelhelix des Templates in Einzel-DNA-Stränge (95 °C, 2 min) begann. Im Anschluss daran erfolgte zyklisch (36 Zyklen/PCR, 40 Zyklen/qPCR) eine kurze Denaturierung (95°C, 30s), eine schnelle Abkühlung (ca. 55-60°C, 30-60s) zur Anlagerung (Annealing) der Primer an die Einzel-DNA-Stränge des Templates und eine Erwärmung (72 °C, 1 min) zur Synthese (Extension) neuer DNA-Doppelstränge mithilfe der Taq-Polymerase und den Nukleotid-Mix. Dieses Temperaturregime ist für jedes Bakterium spezifisch angepasst. Die Annealing-Temperatur variiert aufgrund des G/C-Gehalts der Primerpaare. Auch die Extensions- und Annealingzeiten können unterschiedlich sein.

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (Biometra) unter einer Spannung von 4 V/cm aufgetrennt (1,5 % Agarosegel mit 0,5 µl/ml Ethidiumbromid als DNA-Färbung in TBE-Puffer). Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 300 nm (Transilluminator, Biometra). Zur Identifikation der Polymerisationsprodukte wurde ein Molekulargewichtsmarker von DNA-Fragmenten definierter Länge bis zu 1 kb verwendet (Life Technologies, Gaithersburg, USA).

Bei der sich anschließenden qualitativen Analyse konnten die parodontalpathogenen Spezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* sowie *T. forsythia* mittels spezifischer Primer nachgewiesen werden.

Die spezifischen Primer der Bakterien lauten wie folgt:

F. nucleatum:

Fn for: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3'

Fn rev: 5'-ACA TAA CCA CCT AGA CGC C-3'

PCR-Produkt: 563bp, (Conrads et al. 1997)

P. gingivalis:

Pg for: 5'-ACT GTT AGC AACTAC CGA TGT-3'

Pg rev: 5'-GCG TTA ATC CGG ATT TAT TGG GTT-3'

PCR Produkt: 584bp, (Ashimoto et al.1996)

T. forsythia:

Tf for: 5'-AAA ACA GGG GTT CCG CAT GG-3'

Tf rev: 5'-TTC ACC GCG GAC TTA ACA GC-3'

PCR-Produkt: 426bp, (Meurmann et al. 1997)

Zur Bestimmung der quantitativen bakteriellen DNA-Konzentration der drei nachgewiesenen Bakterienspezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* vor und nach der photodynamischen Therapie kam die Methode der kompetitiven qPCR zur Anwendung. Dabei werden eine bekannte Konzentration einer spezifischen Kompetitor-DNA und die gesuchte DNA als Template in einem PCR-Ansatz koamplifiziert, sie konkurrieren sozusagen in der qPCR-Reaktion. Nach Abschluss der PCR konnten beide PCR-Produkte aufgrund ihrer unterschiedlichen pb-Längen unterschieden bzw. in Relation zueinander gesetzt werden.

Diese Kompetitor-DNA wurde mithilfe des bakterienspezifischen for- und komp-Primer (Fn-komp: 5'-ACA TAA CCA CCT AGA CGC GCT CAT CGT GCA CAC AGA ATT GCT G-3',

Pg-komp: 5'-GCG TTA TCC GGA TTT ATT GGG TTA GGC AGC TTG CCA TAC TGC G-3',

Tf-komp: 5'-TTC ACC GCG GAC TTA ACA GCC AAG GTA CAT GCA ATA AAA TAC-3') hergestellt.

Der Kompetitor-Primer ist so aufgebaut, dass er innerhalb der Sequenz des for/rev Primers bindet und an seinem 5'Ende der rev-Primer synthetisiert wird. Als Template für die Kompetitor-Amplifikation diente isolierte Bakterien-DNA von den oben genannten Bakterienspezies. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde nach Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht und die jeweilige Bande anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Mit Hilfe eines DNA-Gel Extraktions Kits (Qiaex II-Gel Extraktions Kit, Qiagen, BRD) konnte aus der ausgeschnittenen Gelbande die Kompetitor-DNA gewonnen und deren Konzentration gemessen werden. Die Kompetitor-DNA besitzt eine geringere bp-Länge als das PCR-Produkt mit den Basisprimern, aber aufgrund der synthetisierten rev-Primer-Sequenz am Ende des komp-Primers, weist die Kompetitor-DNA nun die gleichen Primerbindungsstellen wie die Template-DNA auf (Abb. 9).

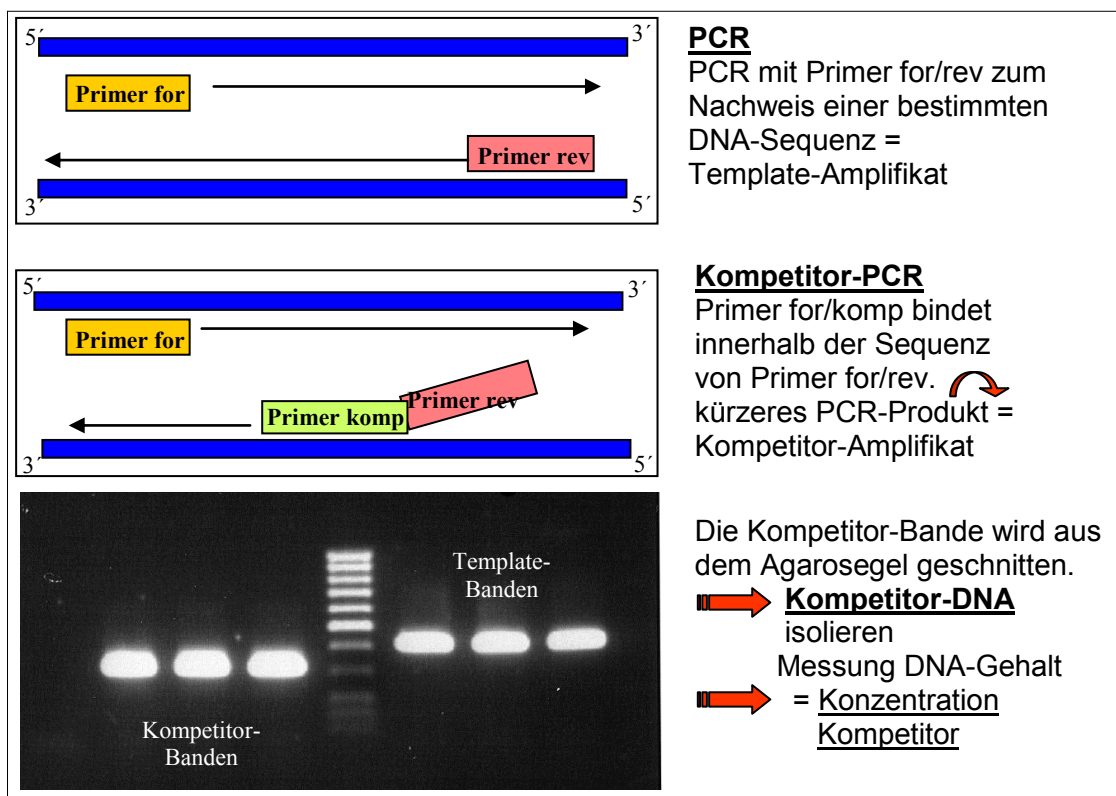


Abb. 9: PCR mit for-, rev- und komp- Primern

Für die kompetitive qPCR kamen wieder der for- und rev-Primer zum Einsatz. Die Kompetitor-DNA wurde im Verhältnis 1:100 mit Aqua destillata verdünnt ($10^{-2} - 10^{-12}$). Im nun folgenden ersten PCR-Lauf konnten jeweils diese Kompetitor-DNA-Verdünnungen zusammen mit der Template-DNA eingesetzt werden, um die vorhandene Konzentration der Template-DNA grob einzugrenzen. Im Agarosegel waren nach dem ersten PCR-Lauf Banden von Kompetitor- und Template-Amplifikat zu erkennen. Die Kompetitor-Verdünnungsstufe, die eine etwas stärkere Bandenintensität als die Template-Bande aufwies, wurde in weiteren 8 Stufen verdünnt (1:2

Verdünnungsreihe). Im zweiten PCR-Ansatz wurden nun diese Verdünnungsstufen (1-8) verwendet. Die PCR-Produkte zeigten im Agarosegel eine sehr feine Abstufung der eingesetzten Kompetitor-DNA. Wenn die Bandenintensitäten der Template- und Kompetitor-DNA gleich stark waren, konnte man schlussfolgern, dass die Template-Probe die gleiche DNA-Konzentration wie die eingesetzte Kompetitor-Verdünnung aufwies (Abb. 10). Für die drei o. g. qualitativ ermittelten Bakterienspezies wurden so quantitative DNA-Konzentrationen von bis zu >2000 pg/ml nachgewiesen.

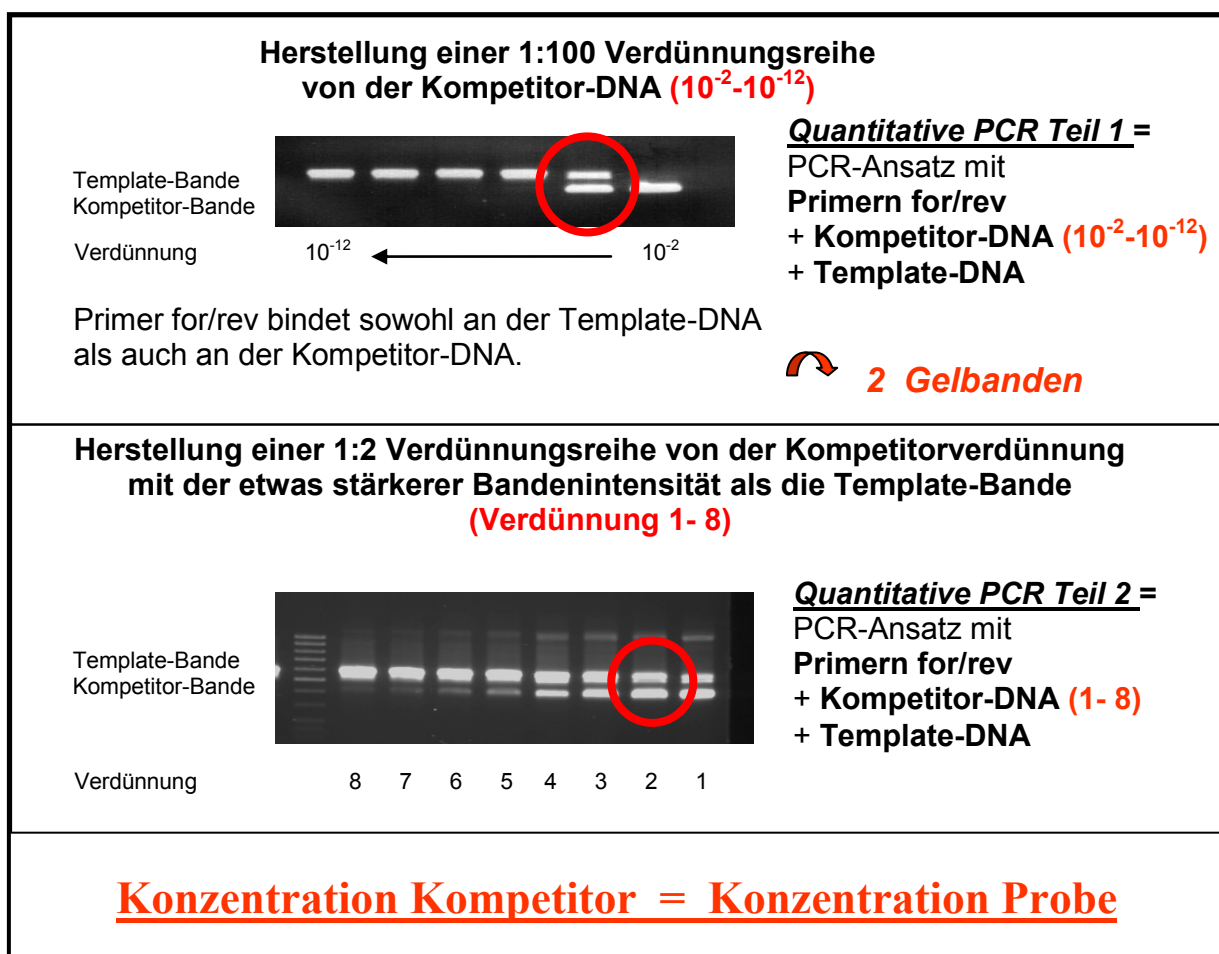


Abb.10: Ablauf der kompetitiven qPCR

7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS, Version 19.0, durchgeführt. Es kamen sowohl deskriptive Statistikmethoden als auch parameterfreie Tests zur Anwendung.

Für die Gesamtkeimzahl (GKZ) und die DNA-Konzentration der mittels qPCR nachgewiesenen Bakterienspezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia*, wurde zu den jeweiligen Nachuntersuchungen (nach 1x PDT, nach 3x PDT, 4 Wochen nach PDT und 3 Monate nach PDT) in beiden Gruppen (Test - und Kontrollgruppe) der Vergleich der Mittelwerte zu den jeweiligen Ausgangswerten geführt.

Die Daten gaben Aufschluss darüber, um wie viel Prozent die Gesamtmenge an Bakterien (GKZ) und die DNA-Menge der drei o. g. Bakterienspezies nach einmaliger bzw. dreimaliger photodynamischer Therapie, sowie nach einem Zeitraum von vier Wochen bzw. drei Monaten posttherapeutisch in der Testgruppe ab- oder zunahm.

Bei den parameterfreien Tests kam der Mann-Whitney-U-Test bzw. der Wilcoxon-Rangsummentest zur Anwendung. Die Nullhypothese des Mann-Whitney-U-Tests lautet $P(X > Y) = 0,5$. Dabei sind X und Y die beiden Zufallsvariablen bzw. Zufallsgrößen, die miteinander verglichen wurden. Gilt die Nullhypothese, so unterscheidet sich die Lage bzw. die zentrale Tendenz der Verteilungen der beiden Zufallsgrößen nicht. Die Testvoraussetzung für zwei unabhängige Stichproben wurde durch die Gruppenaufteilung erfüllt.

Zur Bestimmung der Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen (Test - und Kontrollgruppe) im Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der jeweiligen Untersuchungsintervalle, wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet. Dabei wurde untersucht, ob sich zwei abhängige Stichproben in ihrer zentralen Tendenz unterscheiden. Als statistisch signifikante Veränderung wurde $p < 0,05$ angenommen.

8 Ergebnisse

8.1 Einfluss der aPDT mittels BLC 2003 Gel auf die Gesamtkeimzahl (GKZ)

Die Auswertung der Gesamtkeimzahl (GKZ) erfolgte in der Test- und Kontrollgruppe durch Auszählung der Kolonie bildenden Einheiten (KbE/ml). Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zu den Nachuntersuchungszeitpunkten.

Zur Ausgangsuntersuchung (Baseline) wurde eine Einteilung nach der GKZ in vier verschiedene Gesamtkeimzahlkategorien in 4 log-Schritten von $>10^5$ KbE/ml bis $>10^8$ KbE/ml vorgenommen.

Kategorie 1 mit GKZ $>10^5$ KbE/ml

Kategorie 2 mit GKZ $>10^6$ KbE/ml

Kategorie 3 mit GKZ $>10^7$ KbE/ml

Kategorie 4 mit GKZ $>10^8$ KbE/ml

Es erfolgte die Zuordnung der 20 Patienten der Testgruppe und der 19 Patienten der Kontrollgruppe nach der Gesamtkeimzahlkategorie zur Ausgangsuntersuchung. Alle Probanden verblieben für den gesamten Studienverlauf in ihrer zur Ausgangsuntersuchung ermittelten Kategorie.

Zu den vier posttherapeutischen Untersuchungszeitpunkten (nach 1x PDT, nach 3x PDT, 4 Wochen nach PDT, 3 Monate nach PDT) wurde die Gesamtkeimzahl innerhalb der jeweils genannten Kategoriegruppe erneut bestimmt. Als bakterielle Suppression wurde gewertet, wenn sich die Gesamtkeimzahl um 3 log-Schritte z. B. von 10^8 auf 10^5 reduziert.

Die meisten Patienten der Testgruppe (n=14) waren primär der GKZ-Kategorie 2 zugeordnet worden.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den Kategorien 1 und 2 (mit geringeren GKZ zur Ausgangsuntersuchung) kaum eine Senkung der GKZ in der PDT-Gruppe zu beobachten war (Abb.11). In der Kategorie 3 konnte bereits nach einmaliger PDT-Anwendung eine Keimzahlreduktion um eine Zehnerpotenz erreicht werden, die auch nach drei Monaten noch nachweisbar war. Im

Vergleich zum Ausgangswert konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Eine deutliche bakterielle Suppression wurde nur bei dem Probanden der PDT-Gruppe mit einer hohen GKZ zu Baseline (Kategorie 4) erreicht. Schon nach einmaliger PDT war die GKZ um 2 log-Stufen reduziert (von $>10^8$ auf $>10^6$) und konnte nach 3 Monaten posttherapeutisch um eine weitere Zehnerpotenz auf $>10^5$ verringert werden ($p=0,03$; Abb.11).

In der Kontrollgruppe wurden fast alle Probanden ($n=18$) zur Ausgangsuntersuchung den Kategorien 2 und 3 zugeordnet.

Zu allen Untersuchungszeitpunkten blieb die GKZ in Kategorie 3 in der gleichen log-Stufe ($>10^7$). In der Kategorie 2 konnte im Untersuchungszeitraum ein kontinuierlicher Anstieg der GKZ um insgesamt eine log-Stufe beobachtet werden (von $>10^6$ auf $>10^7$ nach 12 Wochen; Abb.12). Im Vergleich zum Ausgangswert wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt.

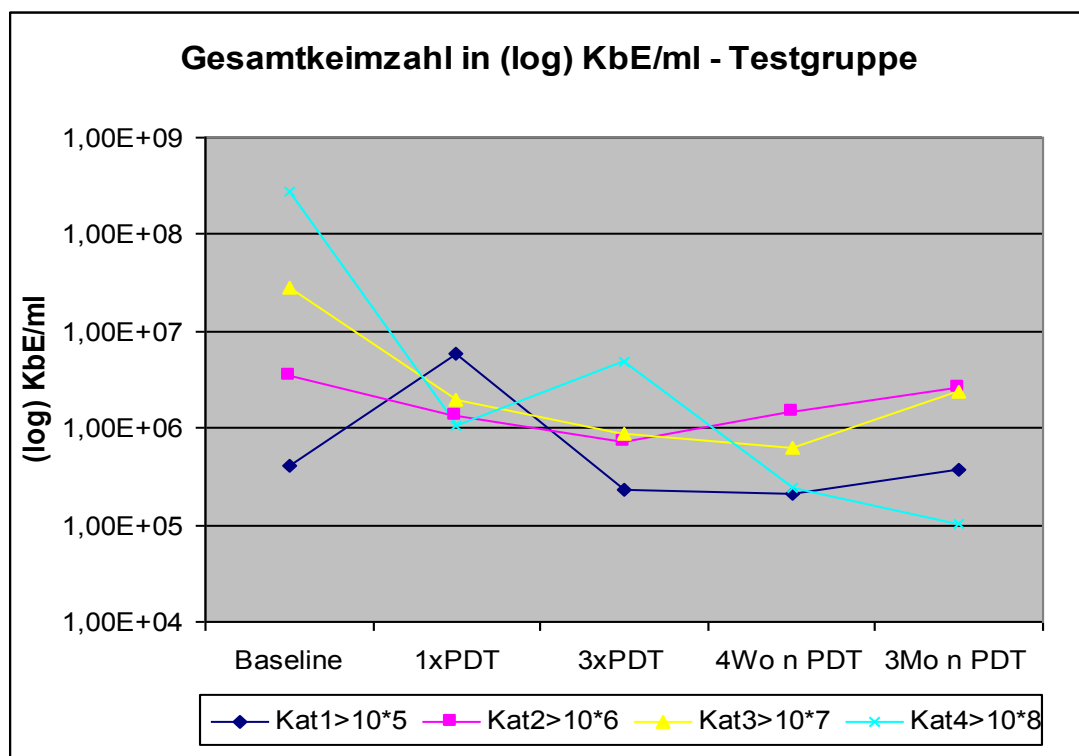


Abb. 11: Veränderung der Gesamtkeimzahl (GKZ) in KbE/ml in 10^{\log} -Stufen durch PDT mittels BLC 2003 Gel in der Testgruppe.

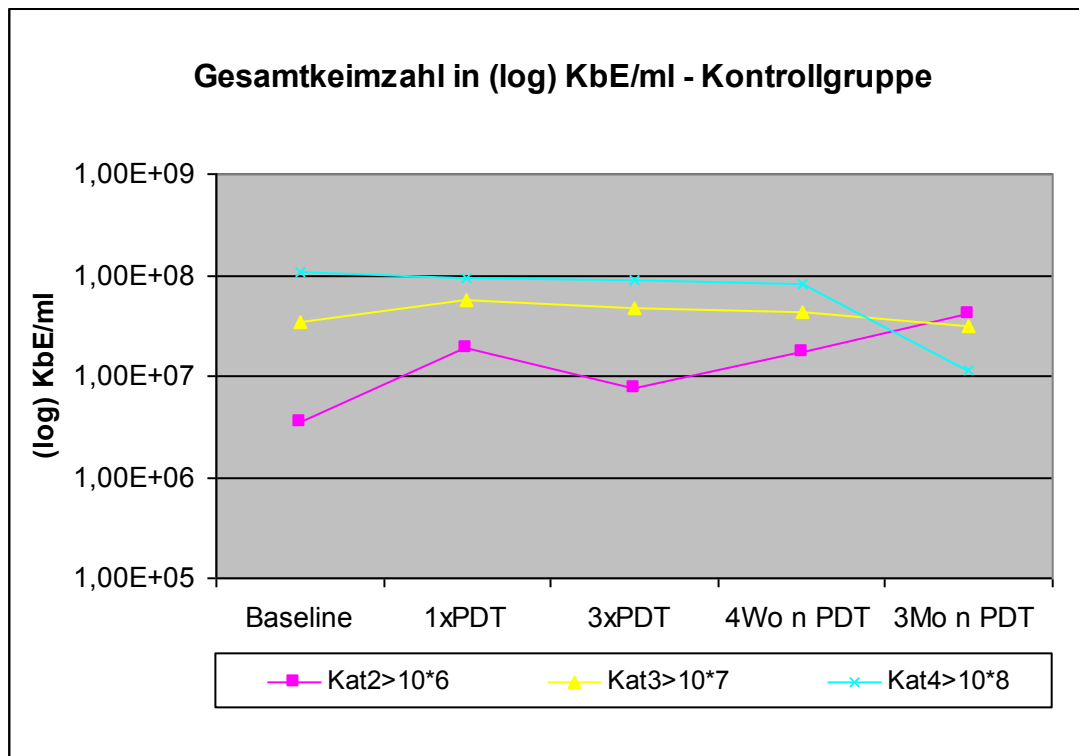


Abb. 12: Veränderung der GKZ in KbE/ml in ¹⁰log-Stufen in der Kontrollgruppe.

Die Abb.13 zeigt die durchschnittliche Gesamtkeimzahl (Mittelwerte) aller Test- und Kontrollgruppenpatienten zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

In der Testgruppe konnte nach einmaliger PDT die durchschnittliche GKZ um einen log-Schritt von $>10^7$ auf $>10^6$ reduziert werden. Nach dreimaliger photodynamischer Therapie wurde dieser Wert nochmals um eine Zehnerpotenz auf $>10^5$ reduziert, stieg aber bereits zu den beiden letzten Nachuntersuchungen (4 Wochen nach PDT und 3 Monate nach PDT) erneut um einen log-Schritt auf $>10^6$ an. Im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

In der Kontrollgruppe hingegen war die durchschnittliche GKZ um einen log-Schritt von $>10^6$ (Baseline) auf $>10^7$ (3 Monate nach PDT) angestiegen. Der Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe war nicht signifikant.

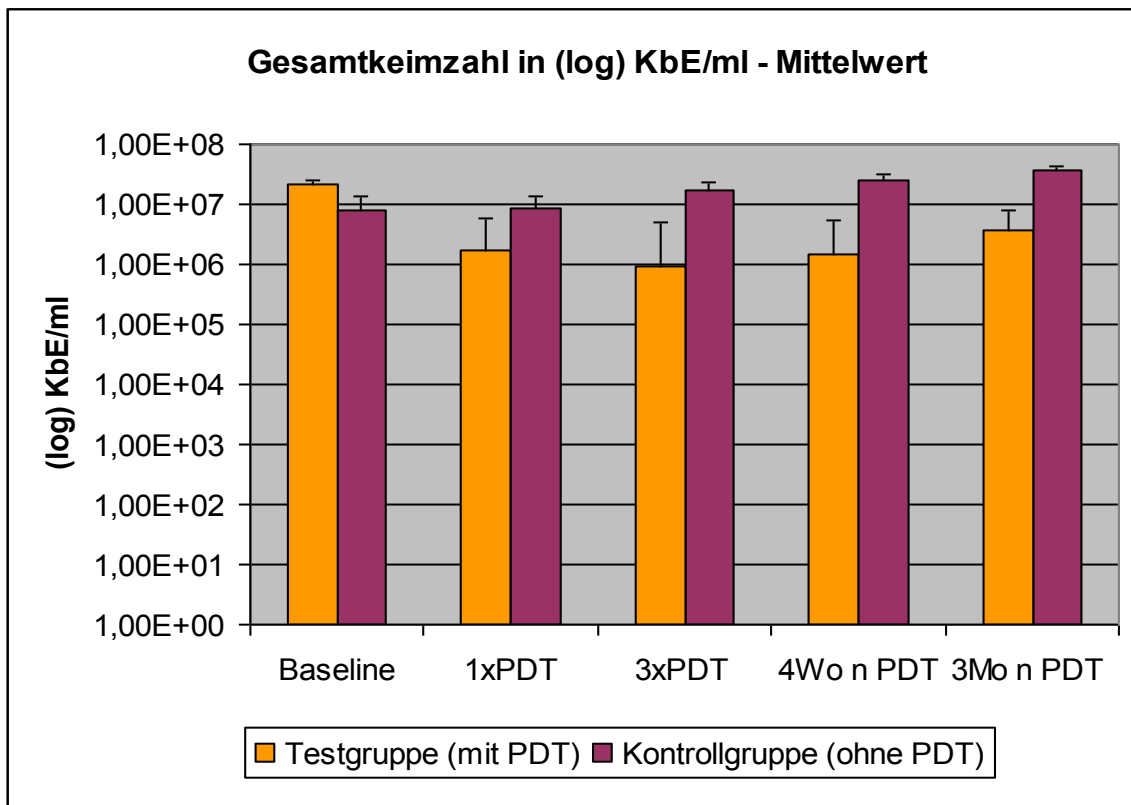


Abb. 13: Veränderung der GKZ (Mittelwert) in KbE/ml in ¹⁰log-Stufen in der Test- und Kontrollgruppe.

8.2 Veränderung der DNA-Konzentration der verschiedenen parodontalpathogenen Bakterienspezies durch aPDT mittels BLC 2003 Gel

Bei allen Probanden der Test- und Kontrollgruppe waren nach der beschriebenen mechanischen Therapie noch die Spezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* nachweisbar. Die Auswertung der mikrobiologischen Untersuchungen zeigt allerdings den Einfluss der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie mittels BLC 2003 Gel auf die durch die qualitative PCR ermittelten parodontalpathogenen Bakterienspezies. Bei allen Probanden (n=39) erfolgte zur Ausgangsuntersuchung eine Einteilung bezüglich der DNA-Menge in die verschiedenen Kategorien.

- Kategorie 1 mit einer DNA-Konzentration <100 pg/ml
- Kategorie 2 mit einer DNA-Konzentration ≥ 100 pg/ml
- Kategorie 3 mit einer DNA-Konzentration $\geq 500-1000$ pg/ml
- Kategorie 4 mit einer DNA-Konzentration >1000 pg/ml.

Während der gesamten Auswertung verblieben alle Probanden in der Ihnen jeweils zugeordneten Kategoriegruppe.

Die quantitative DNA-Konzentration wurde bei allen Probanden zu den posttherapeutischen Untersuchungszeitpunkten ermittelt und mit dem Ausgangswert verglichen (Abb. 3). Die Ergebnissauswertungen für die drei o. g. Bakterienspezies werden im Folgenden aufgezeigt.

8.2.1 *Fusobacterium nucleatum*

Zum Zeitpunkt der Ausgangsuntersuchung lag in der Test- und Kontrollgruppe die durchschnittliche DNA-Konzentration von *F. nucleatum* bei <400 pg/ml.

In der PDT-Gruppe konnte nach der ersten Laseranwendung mit BLC 2003 Gel die DNA-Menge in den Kategoriegruppen 1-4 um ca. 75% reduziert werden (Abb. 14). Nach dreimaliger Anwendung der aPDT reduzierte sich die DNA-Menge von *F. nucleatum* in den Kategoriegruppen 1-4 sogar um fast 91% im Vergleich zum Ausgangswert ($p < 0,001$). Dieses Niveau blieb bis zum 4 wöchigen Recall annähernd stabil. Erst drei Monate posttherapeutisch (3 Monate nach PDT) wurde bei den Probanden der Testgruppe in den Kategoriegruppen 1-3 eine leichte Zunahme der DNA-Konzentration beobachtet.

In der Kontrollgruppe konnte zu den einzelnen Nachuntersuchungszeitpunkten keine Reduzierung der DNA-Konzentration für *F. nucleatum* ermittelt werden. Die Werte blieben in den Kategoriegruppen 1-3 auf einem annähernd gleichen Level (Abb. 15). Im Vergleich zum Ausgangswert zeigten sich in der Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen.

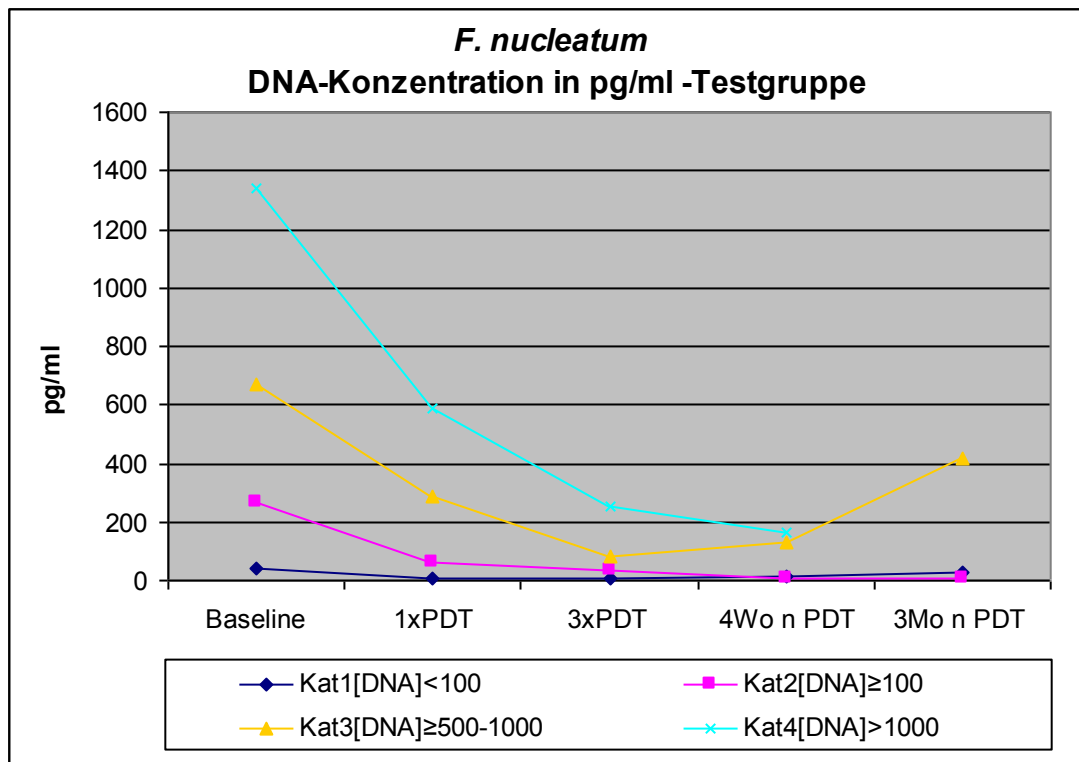


Abb. 14: Veränderung der quantitativen DNA-Konzentration von *F. nucleatum* in pg/ml durch PDT mittels BLC 2003 Gel in der Testgruppe.

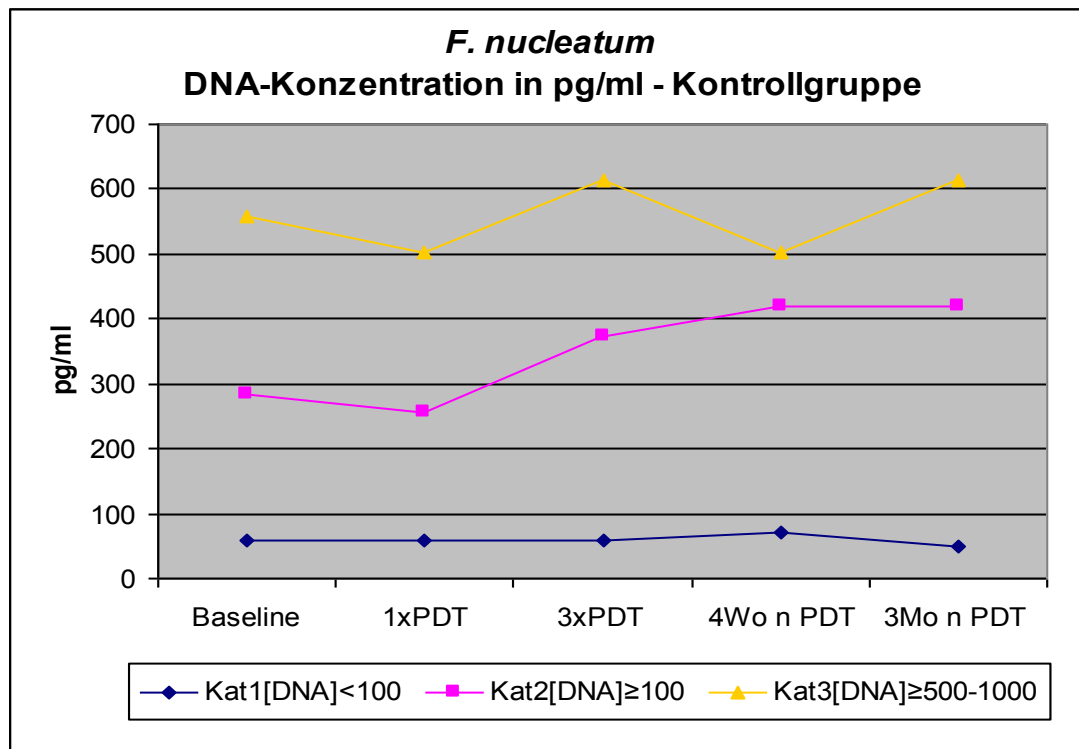


Abb. 15: Veränderung der quantitativen DNA-Konzentration von *F. nucleatum* in pg/ml in der Kontrollgruppe.

Die Abb. 16 zeigt die Veränderung der mittleren DNA-Konzentration (Mittelwert) aller Testpatienten (n=20) nach Anwendung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie mittels BLC 2003 Gel.

Bereits nach einmaliger aPDT reduzierte sich die Bakterien-DNA von durchschnittlich 204,5 pg/ml (Baseline) auf 52,69 pg/ml (nach 1x PDT).

Nach dreimaliger Laseranwendung konnte eine noch deutlichere Reduktion für *F. nucleatum* im Vergleich zum Ausgangswert erreicht werden (21,41 pg/ml nach 3x PDT; $p < 0,001$). Dieser Wert blieb bis 4 Wochen posttherapeutisch auf einem annähernd gleichbleibendem Niveau (19,95 pg/ml). Erst drei Monate nach PDT wurde ein leichter Anstieg der DNA-Konzentration beobachtet (112,21 pg/ml nach 12 Wochen).

In der Kontrollgruppe (n=19) konnte nur zum Zeitpunkt der ersten Nachuntersuchung eine Reduktion der DNA-Menge von 323,03 pg/ml (Baseline) auf 287,89 pg/ml erreicht werden. Danach stieg die DNA-Menge erneut leicht an (537,39 pg/ml nach 12 Wochen; Abb. 16).

Im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung wurde in der Kontrollgruppe keine signifikante Reduktion der DNA-Konzentration für *F. nucleatum* beobachtet.

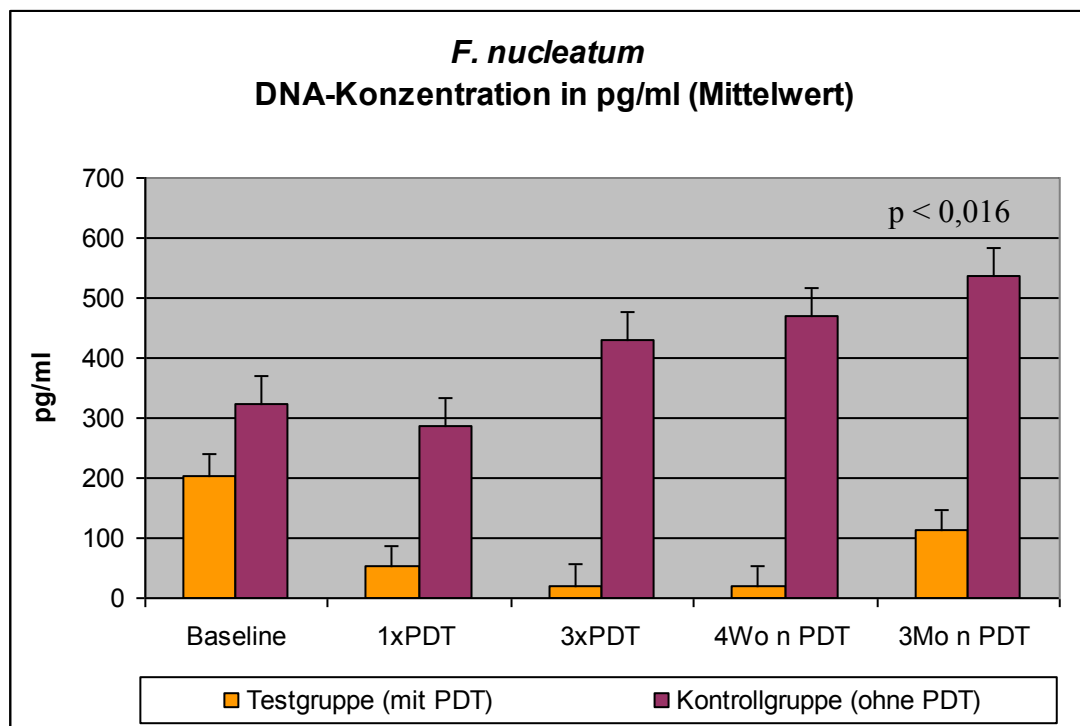


Abb. 16. Mittlere DNA-Konzentration von *F. nucleatum* in pg/ml in der Test- und Kontrollgruppe im Beobachtungszeitraum. Signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe nach 12 Wochen ($p < 0,016$).

8.2.2 *Porphyromonas gingivalis*

Die Bakterienspezies *P. gingivalis* lag in beiden Gruppen zum Zeitpunkt der Ausgangsuntersuchung durchschnittlich in der höchsten Konzentration vor (>600 pg/ml).

In der Testgruppe konnte bereits nach der ersten antimikrobiellen Photodynamischen Therapie mittels BLC 2003 Gel in allen vier Kategoriegruppen 1-4 die DNA-Menge um circa 85% reduziert werden.

Nach dreimaliger Laserbehandlung zeigte sich in allen Kategorien eine fast vollständige Suppression von *P. gingivalis*. Die DNA-Konzentration reduzierte sich auf $< 5\%$ im Vergleich zum Ausgangswert ($p<0,001$). Dieses Ergebnis blieb auch bei den darauf folgenden Nachuntersuchungen (4 Wochen sowie drei Monate nach PDT) auf einem annähernd gleichen Niveau (Abb. 17).

In der Kontrollgruppe wurde lediglich bei den Patienten der Kategoriegruppe 4 mit einer hohen DNA-Konzentration zur Ausgangsuntersuchung zur ersten Nachkontrolle eine leichte Reduzierung der DNA-Menge beobachtet.

Bis zum Zeitpunkt der letzten Nachkontrolle, 3 Monate nach PDT, zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Bakterien-DNA.

Bei den Patienten der Kategoriegruppen 1-3 blieb die DNA-Konzentration für *P. gingivalis* zu allen Nachuntersuchungen auf einem nahezu gleichbleibenden Level (Abb. 18). Im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung zeigten sich in der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede.

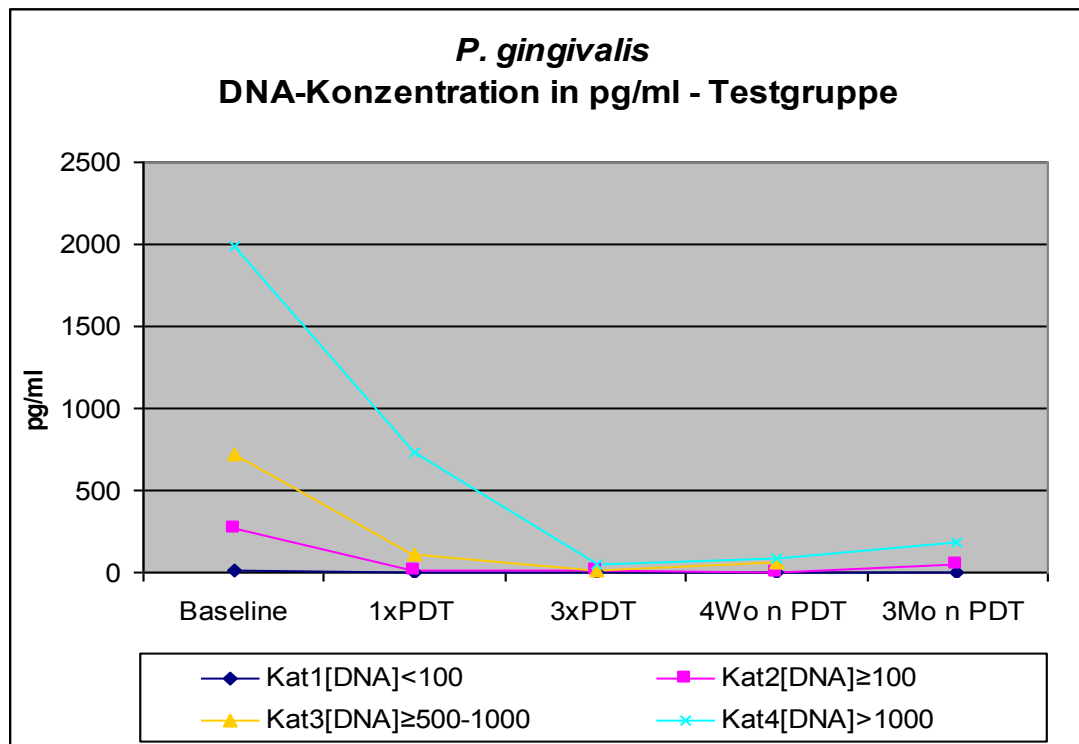


Abb.17: Veränderung der quantitativen DNA-Konzentration von *P. gingivalis* in pg/ml durch PDT mittels BLC 2003 Gel in der Testgruppe.

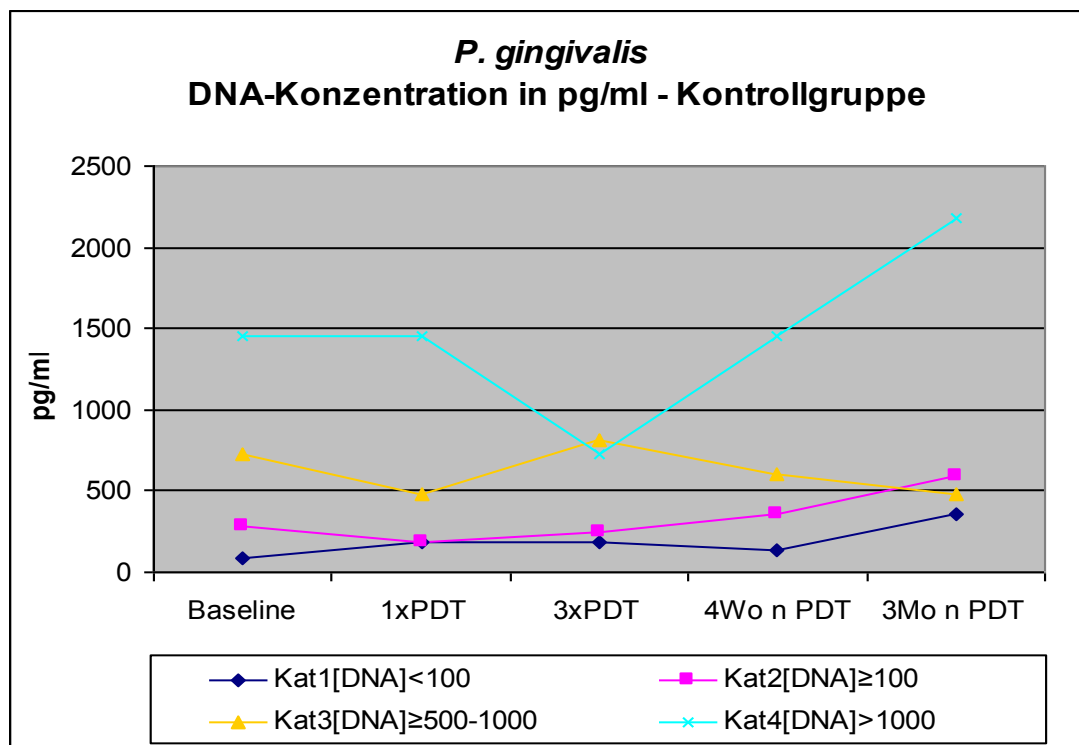


Abb.18: Veränderung der quantitativen DNA-Konzentration von *P. gingivalis* in pg/ml in der Kontrollgruppe.

Die Abb. 19 zeigt den Einfluss der antibakteriellen Photodynamischen Therapie auf die durchschnittliche DNA-Menge (Mittelwert) aller Probanden der Test- und Kontrollgruppe.

Bereits nach einmaliger Laserbehandlung wurde in der PDT-Gruppe eine Reduzierung der durchschnittlichen Bakterien-DNA von 673,7 pg/ml (Baseline) auf 180,26 pg/ml erreicht. Nach dreimaliger PDT reduzierte sich die DNA-Konzentration auf 14,77 pg/ml und damit auf unter 5% im Vergleich zum Ausgangswert ($p < 0,001$). Bis zum 4 wöchigen Recall blieb dieser Wert auf einem annähernd gleichen Niveau und stieg erst zum Zeitpunkt der letzten Nachuntersuchung leicht an (90,62 pg/ml nach 12 Wochen).

Bei den Probanden der Kontrollgruppe zeigte sich im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung (609,19 pg/ml) ein nahezu gleichbleibender Level bis zum Recall nach 4 Wochen (498,38 pg/ml). Zum Zeitpunkt der letzten Nachuntersuchung konnte ein leichter Anstieg der Bakterien-DNA beobachtet werden (792,94 pg/ml nach 12 Wochen). Im Vergleich zum Ausgangswert wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt.

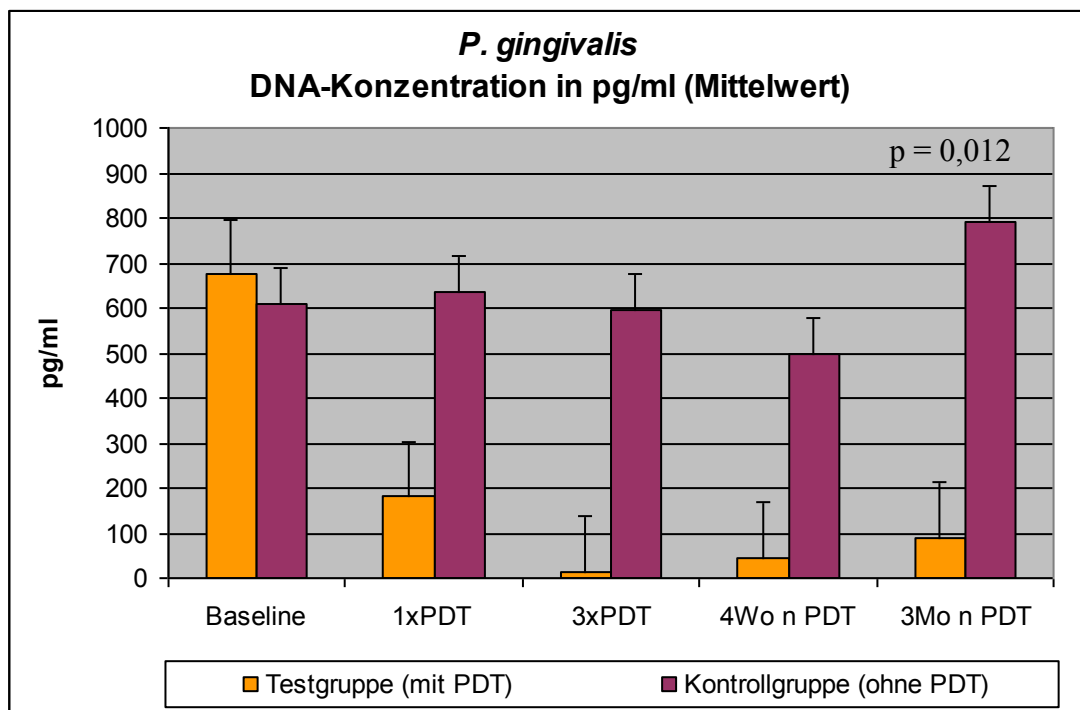


Abb. 19: Mittlere DNA-Konzentration von *P. gingivalis* in pg/ml in der Test- und Kontrollgruppe im Beobachtungszeitraum.
Signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe nach zwölf Wochen ($p=0,012$).

8.2.3 *Tannerella forsythia*

Die durchschnittliche DNA-Menge für *T. forsythia* lag zur Ausgangsuntersuchung in der Test- und Kontrollgruppe in der niedrigsten Konzentration vor (<100 pg/ml).

Die Auswertung der Ergebnisse für die Testgruppe ergab bereits nach einmaliger aPDT mittels BLC 2003 Gel bei den Patienten der Kategorien 1 und 2 eine deutliche Reduzierung der DNA-Menge um fast 72%.

Nach dreimaliger Laseranwendung konnte im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung bei den Probanden beider Kategorien eine fast vollständige Suppression der DNA-Konzentration für *T. forsythia* von ca. 97% erreicht werden ($p<0,001$; Abb. 20). Dieses Niveau blieb bis zur letzten Nachuntersuchung, nach 3 Monaten, in beiden Kategorien nahezu stabil.

In der Kontrollgruppe wurde nachgewiesen, dass die DNA-Menge bei den Patienten der Kategorie 1 während des gesamten Untersuchungszeitraumes ein annähernd konstantes Niveau zeigte. Für die Patienten der Kategorie 2 konnte zum Recall nach 4 Wochen eine geringe, im Vergleich zum Ausgangswert jedoch nicht signifikante Reduktion der DNA-Konzentration für *T. forsythia* beobachtet werden. Danach stieg die DNA-Menge bis zur letzten Nachuntersuchung erneut an (Abb. 21).

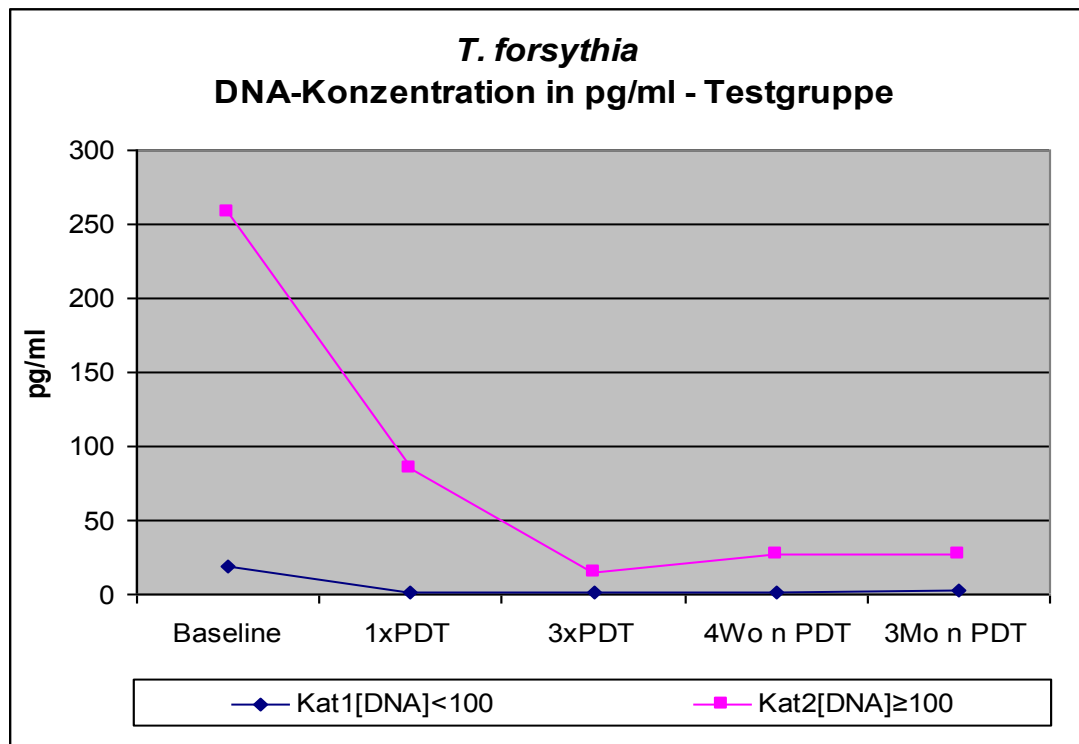


Abb.20: Veränderung der quantitativen DNA-Konzentration von *T. forsythia* in pg/ml durch PDT mittels BLC 2003 Gel in der Testgruppe.

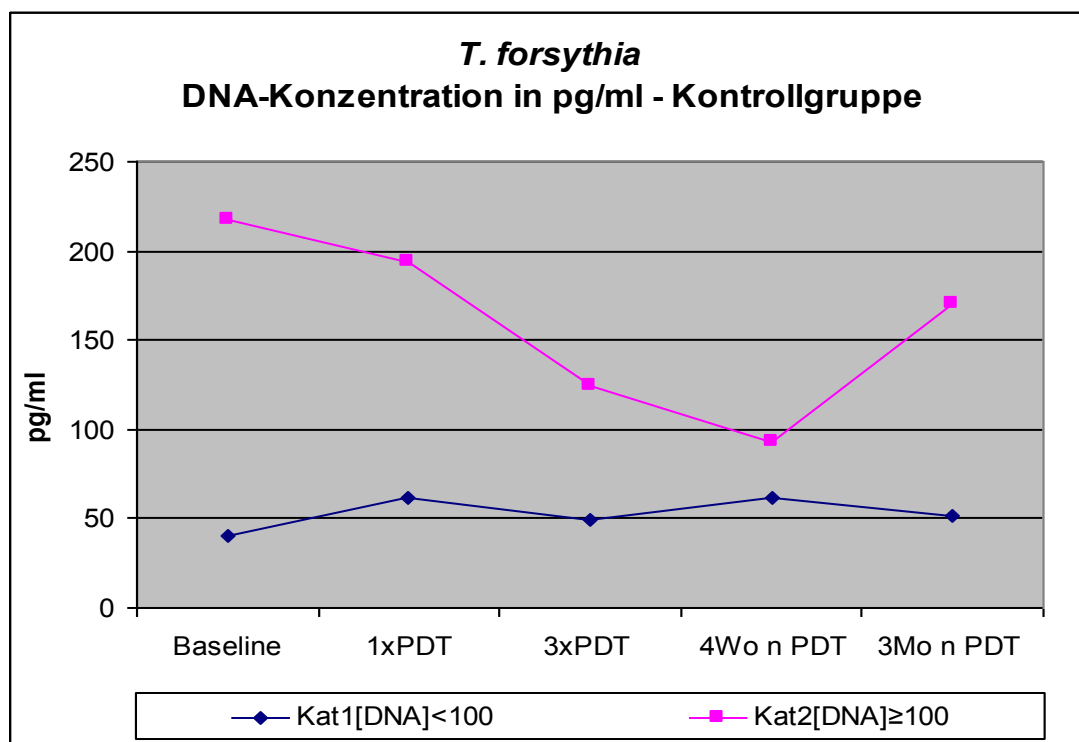


Abb.21: Veränderung der quantitativen DNA-Konzentration von *T. forsythia* in pg/ml in der Kontrollgruppe.

Die Abb. 22 zeigt den Einfluss der aPDT mittels BLC 2003 Gel auf die durchschnittliche DNA-Konzentration in der Test- und Kontrollgruppe.

In der PDT-Gruppe reduzierte sich nach einmaliger Laseranwendung die DNA-Menge von 62,57 pg/ml (Baseline) auf 17,88 pg/ml um fast 72%. Nach dreimaliger aPDT konnte im Vergleich zum Ausgangswert die Bakterien-DNA fast vollständig auf 3,99 pg/ml reduziert werden ($p < 0,001$). Bis zum Zeitpunkt der letzten Nachuntersuchung, drei Monate nach PDT, wurde dieses Niveau nahezu konstant gehalten (10,29 pg/ml nach 12 Wochen).

In der Kontrollgruppe blieb im Beobachtungszeitraum die DNA-Menge im Vergleich zum Ausgangswert (73,30 pg/ml) auf einem annähernd gleichbleibenden Niveau (83,31 pg/ml nach 12 Wochen). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung.

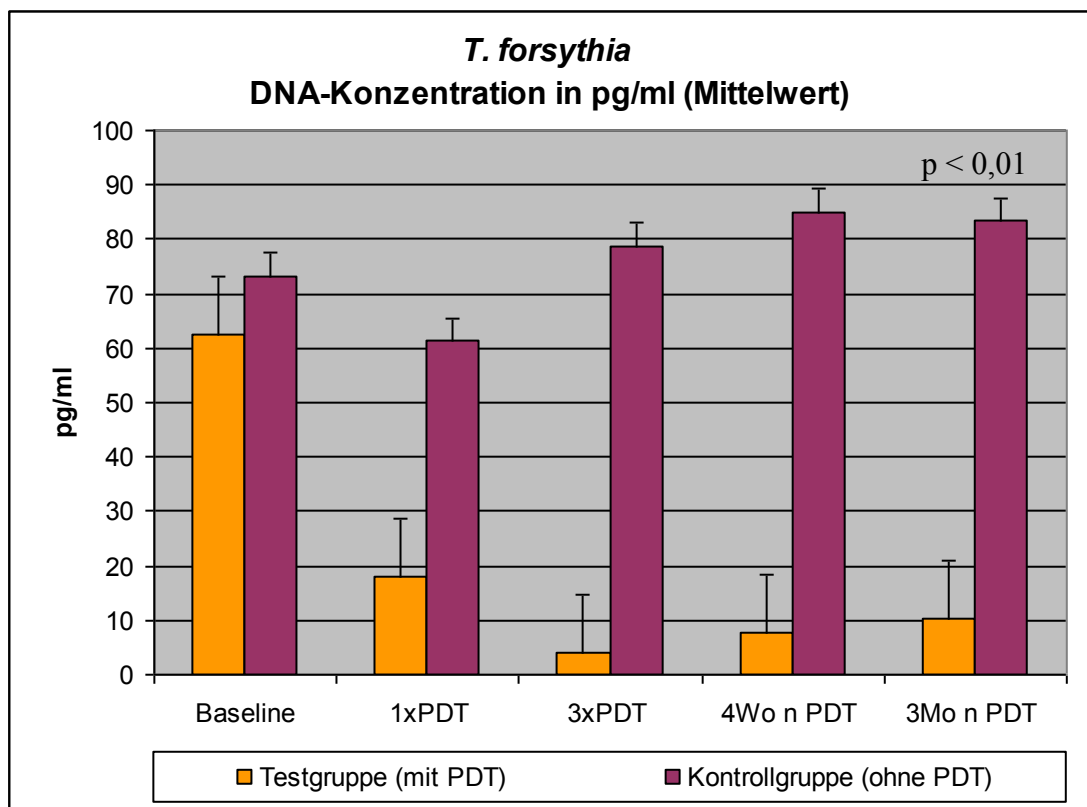


Abb. 22: Mittlere DNA-Konzentration von *T. forsythia* in pg/ml in der Test- und Kontrollgruppe im Beobachtungszeitraum. Signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe nach zwölf Wochen ($p < 0,01$).

9 Diskussion

In der vorliegenden In-vivo-Studie wurde der adjuvante Einsatz der Photodynamischen Therapie als eine alternative Behandlungsmethode zur Suppression parodontalpathogener Bakterien getestet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwendung der aPDT mit dem Photosensitizer BLC 2003 Gel bei Patienten mit lokalisierter chronischer Parodontitis (LCP) zu einer signifikanten Reduktion der Spezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* führt.

Für den erfolgreichen Einsatz der Photodynamischen Therapie, wie in der vorliegenden Untersuchung, spielt eine parodontologische Vorbehandlung (professionelle Zahnreinigung, SRP) eine entscheidende Rolle. Sie gilt als Grundvoraussetzung für den langfristigen Behandlungserfolg bei parodontalen Erkrankungen (Greenstein 1992). Grund dafür ist, dass man bei einem Fehlen der mechanischen Therapie eine zu große Restanzahl parodontalpathogener Spezies auf der Wurzeloberfläche finden würde. Dies würde letztlich zur weiteren Vermehrung der Bakterien und dem Fortschreiten der parodontalen Läsion führen (Bernimoulin 2003). Dennoch wird bisher das Erreichen einer ausreichend glatten und bakterienreduzierten Wurzeloberfläche unter klinischem Aspekt nicht genau definiert (Ferez et al. 1999, Haffajee et al. 2004, Emingil et al. 2004, Bonito et al. 2005, Sigusch et al. 2005a).

Bei allen teilnehmenden Probanden wurde im Vorfeld dieser Studie eine sorgfältige professionelle Zahnreinigung mit Entfernung der supra- und subgingivalen Beläge (SRP) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass trotz akribischer mechanischer Therapie die Bakterienspezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* bei allen Patienten der Test- und Kontrollgruppe nachweisbar waren. Das lässt vermuten, dass durch alleiniges Scaling und Wurzelglätten eine ausreichende Reduzierung der Bakterienspezies auf der Wurzeloberfläche nicht erreicht werden kann und mit einem Verbleib von Biofilmresten zu rechnen ist.

So muss man außerdem davon ausgehen, dass die parodontalpathogenen Bakterien in der Lage sind, auch weiter in das umliegende Gewebe einzudringen und das Fortschreiten der Läsion bzw. Reinfektion zu bewirken (Nishihara und Koseki 2004, de Oliveira et al. 2007, Demmer et al. 2008). Durch die Arbeitsgruppe um Neugebauer et al. wird bestätigt, dass parodontalpathogene Bakterien in verschiedene Zellschichten penetrieren (Neugebauer et al. 2004).

Unter dem Aspekt der unvollständigen mechanischen Entfernung des Biofilms von der Wurzeloberfläche mittels SRP ist es daher fraglich, ob die alleinige mechanische Therapie auch bei Patienten mit chronischer Parodontitis ausreichend ist, um die parodontalpathogenen Bakterienspezies ausreichend zu supprimieren.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, waren bei LCP-Patienten nach alleinigem SRP die parodontalpathogenen Spezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* nachweisbar. Aus diesem Grund wird zunehmend diskutiert, dass nach rein mechanischem Vorgehen weitere alternative adjuvante Behandlungsstrategien notwendig sind, um eine ausreichende Suppression der parodontalpathogenen Spezies zu erreichen (Sigusch et al 2001, Sigusch et al 2005a, Konopka & Goslinski 2007).

Dem Einsatz der Photodynamischen Therapie könnte in diesem Kontext nach akribischem SRP eine besondere Rolle zukommen, speziell bei Patienten, bei denen eine Antibiotikatherapie noch nicht indiziert ist.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, konnte durch die Anwendung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie mit dem Photosensitizer BLC 2003 Gel ein geringfügiger, nicht signifikanter Einfluss auf die orale Gesamtkeimzahl (GKZ) erzielt werden.

In der Literatur sind bisher keine Arbeiten zu finden, die die Wirkung der aPDT auf die Gesamtkeimzahl beobachtet haben. Bei der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse zeigte sich, dass unmittelbar nach dreimaliger Applikation der aPDT die mittlere GKZ um zwei ¹⁰log-Schritte reduziert werden konnte. Zu den weiteren Nachuntersuchungszeitpunkten wurde allerdings wieder ein Anstieg ermittelt.

Es zeigte sich, dass die GKZ bei LCP-Patienten zwar durch die angewendete Methodik der Photodynamischen Therapie beeinflussbar ist,

allerdings war dieser Effekt nicht signifikant und blieb im Untersuchungszeitraum nicht stabil.

Ein wichtiger Fokus für eine erfolgreiche Parodontitistherapie liegt auf der Elimination der parodontalpathogenen Schlüsselbakterien. Dazu gehört beispielsweise auch *F. nucleatum*, eine frühbesiedelnde Spezies der Mundhöhle (van Winkelhoff et al. 2002), die sich an der Pellikelschicht anlagert und unter den Bedingungen der Plaqueretention, z. B. in sogenannten Nischen, vermehren kann.

In der vorliegenden Studie hat sich die Anwendung der Photodynamischen Therapie mit dem Photosensitizer BLC 2003 Gel als eine effektive adjuvante Behandlungsmethode u. a. zur Suppression von *F. nucleatum* erwiesen.

Ein wichtiges Ergebnis ist der Nachweis des aPDT-Effektes auf die Spezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten.

Pfitzner et al. konnten bereits 2004 in einer In-vitro-Studie die Wirksamkeit der aPDT mittels verschiedener Photosensitizer auf *F. nucleatum* nachweisen. Dabei waren die beiden Sensitizer Chlorin e6 (10µM) und BLC 1010 (10µM) besonders effektiv (Pfitzner et al. 2004).

Inzwischen sind auch einige In-vivo-Studien publiziert worden, die zeigen konnten, dass parodontopathogene Bakterien durch die aPDT supprimierbar sind (Haas et al. 2000, Dörtbudak et al. 2001, Shibli et al. 2003, Sigusch et al. 2005, Shibli et al. 2006).

So wurde auch in einer In-vivo-Studie der Jenaer Arbeitsgruppe die Wirksamkeit der Photodynamischen Therapie mittels Helbo-Verfahren bei Patienten mit lokalisierter chronischer Parodontitis nachgewiesen (Sigusch et al 2010).

Mit der Anwendung des Helbosystems (Diodenlaser-660nm, 60 mW/cm², Phenothiazin-Chlorid-Photosensitizer) konnte die DNA-Konzentration von *F. nucleatum* im Vergleich zur Kontrollgruppe posttherapeutisch bis zu einem Zeitraum von zwölf Wochen signifikant reduziert werden.

Wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, konnte die DNA-Konzentration für *F. nucleatum* in der Testgruppe bei Patienten mit LCP durch die aPDT mittels BLC 2003 Gel signifikant reduziert werden.

Ein signifikanter antibakterieller Effekt war allerdings nur bis vier Wochen nach aPDT nachweisbar. Möglich ist, dass der supprimierende Effekt, der durch Safraninderivate im Rahmen der aPDT ausgelöst wird, auf *F. nucleatum* scheinbar nicht so langfristig wirksam ist, wie beispielsweise nach Verwendung von Phenothiazinen. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die Patienten der vorliegenden Studie ein fortgeschrittenes Parodontitisstadium aufwiesen.

Anhand der vorliegenden Daten wird deutlich, dass durch die Methode der aPDT auch die DNA-Konzentration von *P. gingivalis* und *T. forsythia* sehr effektiv supprimiert werden konnte und eine fast vollständige Elimination der beiden Spezies zu beobachten war. Dieser effiziente antibakterielle Effekt ließ sich bis zu einem Zeitraum von zwölf Wochen nachweisen.

So konnte beispielsweise auch in einer tierexperimentellen Studie der Arbeitsgruppe um Sigusch et al. die antibakterielle Wirkung der aPDT auf *P. gingivalis* ermittelt werden. In dieser Untersuchung wurden gesunde Beagle-Hunde u. a. mit *P. gingivalis* in allen subgingivalen Bereichen infiziert und nach Erreichen des mikrobiellen steady states mit unterschiedlichen Photosensitizern (Chlorin e6, BLC 1010) und einem Diodenlaser (3,85 W/cm³; 12,7 J/cm³, 662 nm) behandelt. Posttherapeutisch war es möglich, die Spezies *P. gingivalis* signifikant zu reduzieren (Sigusch et al. 2005).

Es lässt sich vermuten, dass im Zusammenhang mit der erfolgreichen Suppression von *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* durch die aPDT auch bestimmte Zytokine, u. a. Tumornekrosefaktor und Interleukin-1 beeinflusst werden.

Es ist bekannt, dass durch diese beiden Zytokine beispielsweise körpereigene Matrixmetalloproteinasen aktiviert werden und damit der Gewebsverlust gefördert wird (Nishihara und Koseki 2004). Der TNF wirkt sich auch negativ auf parodontale Fibroblasten aus und fördert gleichzeitig die Apoptose der Bindegewebszellen.

So konnte beispielsweise in einer In-vitro-Studie nach einmaliger Applikation der aPDT die signifikante Suppression von *P. gingivalis* und die Inaktivierung von Proteasen sowie der beiden Zytokine TNF und IL-1 nachgewiesen werden (Braham et al. 2009).

In verschiedenen Untersuchungen wurde bereits auch gezeigt, dass mittels Photodynamischer Therapie nicht nur die parodontalpathogenen Bakterienspezies sondern auch die klinischen Entzündungszeichen wie die Rötung und die Blutung nach Sondierung reduzierbar sind (Christodoulides et al. 2008, Braun et al. 2008, Chondros et al. 2009, Sigusch et al. 2010).

Die klinischen Parameter wie PI, Rötung, BnS, ST und AL wurden in der vorliegenden Studie nur zur Ausgangsuntersuchung erfasst. Die Wirkung der aPDT mit dem Photosensitizer BLC 2003 auf die klinischen Parameter zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten erfolgt in einer separaten Auswertung, so dass zur Beeinflussung dieser Parameter durch die aPDT in der vorliegenden Arbeit keine weiteren Aussagen getroffen werden können.

Ein anderes wichtiges Kriterium, das für den weiteren klinischen Einsatz der Photodynamischen Therapie spricht, wird durch die Arbeitsgruppe um Wainwright et al. hervorgehoben. Die Autoren beschrieben die Wirksamkeit der aPDT gegenüber antibiotikaresistenten bzw. antibiotikasensitiven Bakterien. Demnach gibt es keine nachweisbare Resistenzbildung der parodontopathogenen Spezies gegenüber einer mehrfachen Photosensibilisierung bzw. der zytotoxischen Aktivität von Singulett-Sauerstoff (Wainwright et al. 2004).

In der vorliegenden Studie wurde die Photodynamische Therapie an drei aufeinander folgenden Tagen als Mundgesamtbehandlung angewendet. Die Methode der Mundgesamtbehandlung wird von Sigusch et al. 2001 für Parodontitispatienten beschrieben.

Die Auswertung der vorliegenden Ergebnisse der drei Bakterienspezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* spricht für den therapeutischen Effekt nach einer mehrfachen Applikation der PDT. Insgesamt war die Effizienz der Bakteriensuppression durch die mehrfache Anwendung der aPDT auf alle drei Spezies deutlich nachweisbar. Speziell die DNA-Konzentration von *P. gingivalis* und *T. forsythia* war nach dreimaliger Lasertherapie fast vollständig reduziert.

Polansky et al. sahen in einer Studie aus dem Jahr 2009 die Anwendung der aPDT bei Patienten mit chronischer Parodontitis aber eher kritisch. Die DNA-Konzentration für *P. gingivalis* sowie auch die klinischen Parameter der Test- und Kontrollgruppe (Testgruppe: Wurzelglätten durch Ultraschall und

adjuvante PDT- einmalige Applikation; Kontrollgruppe: Wurzelglätten durch Ultraschall allein) konnte zwar reduziert werden, allerdings war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar (Polansky et al. 2009).

Möglicherweise ist der fehlende Nachweis des aPDT-Effektes darauf zurück zu führen, dass die aPDT in der erwähnten Studie nur als einmalige Applikation zur Anwendung kam. Ob auch die mechanische Therapie mittels Ultraschall einen Einfluss hat, kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

In der Literatur sind bisher nur klinische Vergleichsstudien zu finden, in denen die Wirkung von Methylenblau und Toluidinblau bzw. Phenothiazinen in Verbindung mit einem Diodenlaser als PDT-Verfahren getestet wurden (Konopka und Goslinski, 2007, de Oliveira et al. 2007, Braun et al. 2008, Christodoulides et al. 2008, Sigusch et al. 2010).

Bislang liegt noch keine publizierte Studie über die Anwendung von Safraninderivaten als Photosensitizer im Rahmen der aPDT vor, wie er in der vorliegenden Arbeit getestet wurde.

Bei dem System der Biolitec AG (Diodenlaser 532 nm, Ausgangsleistung 0,25W) wurde der Photosensitizer BLC 2003 als rötlich-farbiges Gel in einer Konzentration von 5 mmol verwendet. Im Vergleich zu den bisher untersuchten Sensitizern (Methylenblau, Toluidinblau) führte dieser beispielsweise nicht zu einer Blaufärbung der Mundschleimhaut. Stattdessen verfärbten sich die gingivalen Bereiche in einem leicht rötlichen Farbton, was von den meisten Probanden als wenig störend empfunden wurde. Das könnte auch dazu führen, dass Safraninderivate im Bezug auf eine kosmetische Beeinträchtigung nach Applikation, gegenüber den anderen blaufärbenden Sensitizern, zukünftig bevorzugt angewendet werden. Denn wie die vorliegende Studie zeigt, ist eine deutliche antibakterielle Wirkung der aPDT mit dem BLC 2003 Gel auf parodontalpathogene Bakterienspezies nachweisbar.

Mit der erfolgreichen Suppression der parodontalpathogenen Spezies *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* durch die Methodik der aPDT, wie sie in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden konnte, ist man möglicherweise auch in der Lage, die Gesundheit der behandelten Patienten positiv zu beeinflussen.

In der Literatur wird diskutiert, dass beispielsweise chronische Parodontitiden mit entsprechenden oralen Entzündungsherden einschließlich häufiger Bakteriämien auch mit systemischen Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Lungenerkrankungen assoziiert sein können (Beck et al. 2000, Garcia et al. 2001, Dave et al. 2005).

Deshalb könnte eine erfolgreiche Suppression von *P. gingivalis* durch die aPDT, wie sie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde, möglicherweise auch das Arteriosklerose-Risiko bzw. auch thrombotische Komplikationen verringern.

Insbesondere die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und insgesamt des zellulären und humoralen Gerinnungssystems durch Gingipaine der Spezies *P. gingivalis* (Brodalla et al. 2005) könnte indirekt durch die Anwendung der Methodik der Photodynamischen Therapie beeinflusst werden.

Derzeit wird außerdem diskutiert, dass es Parallelen zwischen dem Bakterienspektrum der Periimplantitis und dem der Parodontitis gibt (Sbordone et al. 2003, Takanashi et al. 2004, Sigusch 2006). In einer tierexperimentellen Untersuchung von Hayek et al. 2005 konnte der antibakterielle Effekt der aPDT (Diodenlaser 660 nm, Azulene-Sensitizer) bei induzierter Periimplantitis nachgewiesen werden. Speziell die DNA-Konzentration von *F. nucleatum* wurde nach Applikation der aPDT signifikant reduziert.

Auch in einer Untersuchung der Arbeitsgruppe um Dörtbudak et al. 2001 wird über den antibakteriellen Effekt der Photodynamischen Therapie bei Patienten mit Periimplantitis berichtet. Dabei konnte u. a. die DNA-Konzentration der parodontalpathogenen Spezies *P. gingivalis* effektiv supprimiert werden.

Die in der vorliegenden Studie beschriebene Methodik der Photodynamischen Therapie lässt sich möglicherweise auch bei Patienten mit Periimplantitis einsetzen, da bei dieser Erkrankung ein ähnliches Bakterienspektrum vorliegt.

Allerdings scheinen bezüglich der routinemäßigen Anwendung der aPDT weitere, gut strukturierte klinische Untersuchungen, wie die hier vorliegende, notwendig. Darauf weisen auch die Autoren in einem kürzlich veröffentlichten Review über die Methodik der Photodynamischen Therapie

mit verschiedenen Photosensitizern und den entsprechenden Diodenlasern hin (Azarpazhooh et al. 2010).

Es wird u. a. diskutiert, dass in zukünftigen Studien die exakte Klassifizierung der Patienten bezüglich ihrer parodontalen Erkrankung erfolgen muss. Diese Forderung wurde in der vorliegenden Studie berücksichtigt. Zudem sollten möglichst einheitliche Behandlungsregime festgelegt werden und die Anwendung der aPDT exakt definiert werden.

Entscheidend ist aus Sicht der Autoren auch die Tatsache, dass die Photodynamische Therapie möglichst wie in der vorliegenden Untersuchung nach konventioneller Therapie (SRP) durchgeführt werden sollte, um zunächst die Gesamtmenge der Plaque zu reduzieren und den Behandlungserfolg anschließend nachhaltig sichern zu können. Nur so scheint es langfristig möglich, die Photodynamische Therapie als eine effektive Behandlungsstrategie zur Behandlung parodontaler Erkrankungen auch als routinemäßige Methodik zu etablieren.

In der vorliegenden Untersuchung wurden durch die Anwendung der aPDT bei Patienten mit einer lokalisierten chronischen Parodontitis parodontalpathogene Schlüsselbakterien erfolgreich supprimiert.

Möglicherweise hat die Methodik der Photodynamischen Therapie aber auch das Potential, bei schweren Parodontitisformen eingesetzt werden zu können. Dies zeigt eine aktuelle Studie der Arbeitsgruppe um Novaes et al. 2012. In dieser Untersuchung wurde die aPDT bei Patienten mit aggressiver Parodontitis angewendet. Nach Applikation der Photodynamischen Therapie war es möglich, speziell auch die parodontalpathogene Bakterienspezies *A. actinomycetemcomitans* erfolgreich zu reduzieren (Novaes et al. 2012).

A. actinomycetemcomitans wird häufig bei Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis nachgewiesen (Bodur et al. 2001, Kaplan et al. 2002). Aufgrund seiner gewebspenetrierenden Eigenschaften ist eine erfolgreiche, rein konventionell-mechanische Therapie meist nicht möglich (Sigusch et al. 2001).

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich LCP-Patienten behandelt, bei denen *A. actinomycetemcomitans* nicht nachweisbar war.

Ob zukünftig die aPDT auch bei mittelschweren bis schweren Parodontitisformen erfolgreich eingesetzt werden kann, muss jedoch durch

weitere klinische Studien untersucht werden. Bisher wird bei schweren Parodontitisformen noch immer die adjuvante Gabe von Antibiotika empfohlen (Hayek et al. 2005, Sigusch et al. 2005).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die adjuvante Anwendung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie mit dem Photosensitizer BLC 2003 Gel nach konventioneller Therapie (SRP) zu einer deutlichen Suppression von parodontalpathogenen Schlüsselbakterien führt.

Mit dieser aPDT-Methodik konnten *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* signifikant supprimiert werden.

10 **Schlussfolgerungen**

In der vorliegenden In-vivo-Studie konnte der Effekt der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie bei Patienten mit lokalisierter chronischer Parodontitis (LCP) mit dem System der Biolitec-AG Jena (Photosensitizer BLC 2003 Gel) nachgewiesen werden.

Der eingesetzte Photosensitizer BLC 2003 Gel in Kombination mit dem Ceralas G2 Diodenlaser (532 nm) erwies sich als klinisch wirksam.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass bei LCP-Patienten nach adjuvanten Einsatz der aPDT mit dem Photosensitizer BLC 2003 Gel die parodontalpathogenen Schlüsselbakterien *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* bis zu einem posttherapeutischen Zeitraum von 12 Wochen signifikant supprimiert werden konnten.

Nach mehrfacher Applikation der aPDT als Mundgesamtbehandlung an drei aufeinander folgenden Tagen sowie im gesamten Untersuchungszeitraum waren keinerlei Nebenwirkungen der Photodynamischen Therapie nachweisbar.

Die vorliegende Studie zeigt, dass durch den adjuvanten Einsatz der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie Patienten mit lokalisierter chronischer Parodontitis und einer Infektion mit *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* erfolgreich behandelt werden können.

Ob die adjuvante aPDT allerdings auch bei ausgeprägten, schweren Parodontitisformen als Alternative zur Antibiotikatherapie angewendet werden kann, muss durch weitere klinische Studien geklärt werden.

11 **Literaturverzeichnis**

Addy M (1999). Antiseptika in der parodontalen Therapie. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, Hrsg. Klinische Parodontologie und Implantologie. Berlin, Chicago, London, Paris, Tokio, Barcelona, Sao Paulo, Moskau, Prag, Sofia, Warschau: Quintessenz-Verlag, 461-487.

Albandar JM, Rams TE (2002). Risk factors for periodontitis in children and young persons. Periodontol 29: 207 – 222.

Allison RR, Cuenca RE, Downie GH, Camnitz P, Brodish B, Sibata CH (2005). Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers – a review of applications and outcomes. Photodiagn Photodyn Ther 2: 205 – 222.

Armitage GC (1999). Development of classification systems for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 4: 1-6.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I and Slots J (1996). Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Microbiol Immunol 11: 266-273.

Azarpazhooh A, Shah PS, Tennebaum HC, Goldberg MB (2010). The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systemic review and meta-analysis. J Periodontol 81: 4-14.

Beck JD, Slade G, Offenbacher S (2000). Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. Periodontol 23: 110 – 120.

Bernimoulin JP (2003). Recent concepts in plaque formation. J Clin Periodontol 30: 7-9.

Biel M (2006). Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. *Lasers Surg Med* 38: 349 – 355.

Biel MA (2002). Photodynamic therapy in head and neck cancer. *Curr Oncol Rep* 4: 87 – 96.

Blix IJ, Hars R, Preys HR, Helgeland K (1992). Entrance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* into Hep – 2 cells in vitro. *J Periodontol* 63: 723 - 728.

Bodur A, Bodur H, Bal B and Balos K (2001). Generalized aggressive periodontitis in a prepubertal patient: a case report. *Quintessence Int* 32: 303-308 In: Doll K, Angelus T. Vitalitätsverlust parodontopathogener Bakterien durch die Photodynamische Therapie. Dissertation. 2005

Bollen CML, Quirynen M (1996). Microbial response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. *J Periodontol* 67: 1143 – 1158.

Bonito AJ, Lux L, Lohr KN (2005). Impact of local adjuncts to scaling and root planning in periodontal disease therapy: a systemic review. *J Periodontol* 76: 1227-1236.

Bordala N, Menicks EP, Bellinger DA, Damrongsri D, Offenbacher S, Beck J, Medianos P, Sotres D, Chang YL, Koch G, Nichols TC (2005). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1446 – 1451.

Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK and Allison C (1998). Role of *Fusobacterium nucleatum* and Coaggregation in anaerobe survival in Planktonic and Biofilm oral Microbial communities during aeration. *Infection and Immunity* 10: 4729-4732.

Braham P, Herron C, Street C, Darveau R (2009). Antimicrobial Photodynamic Therapy May Promote Periodontal Healing Through Multiple Mechanisms. *J Periodontol* 80: 1790-1798.

Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S (2008). Short term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 35: 877 – 884.

Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N & Sculean A (2009). Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients in periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 24: 681 – 688.

Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, Sculean A (2008). Photodynamic Therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 9: 1638 – 1644.

Cobb CM (2006). Lasers in periodontics: a review of the literature. *J Periodontol* 77: 545 – 564.

Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F and Shah HN (1997). The use of a 16 S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endodont* 23: 432-438.

Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL, Slots J (1999). Relationship between herpesvirus and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 70: 478 – 484.

Cortelli JR, Querido SM, Aquino DR, Ricardo LH, Pallos D (2006). Longitudinal clinical evaluation of adjunct minocycline in the treatment of chronic periodontitis. *J Periodontol* 77: 161 – 166.

Czihak G, Langer H und Ziegler H (1992). Hrsg. Biologie. 5. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York; Springer – Verlag, 115.

Dahlen G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okomoto H (1992). The effect of supragingival plaque control on the subgingival microflora in subject with periodontal disease. J Clin Periodontol 19: 802 – 809.

Dave S, Batista ELJ, van Dyke TE (2005). Cardiovascular disease and periodontal diseases: commonality and causation. Compent Contin Educ Dent 25: 26 – 37.

De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG (2007). Influence of photodynamic therapy on the development of ligature – induced periodontitis in rats. J Periodontol 78: 566 – 575.

Demmer RT, Papapanou PN, Jacobs DR, Jr, Desvarieux M (2008). Bleeding on probing differentially relates to bacterial profiles: the oral infections and vascular disease epidemiology study. J Clin Periodontol 35: 479-486.

De Oliveira RR, Schwartz – Filho HO, Novaes ABJ, Taba MJr (2007). Antimicrobial photodynamic therapy in the non – surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. J Periodontol 78: 965 – 973.

Dobson J, Wilson M (1992). Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low – power laser. Arch Oral Biol 37: 883 – 887.

Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath – Pokorny G (2001). Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of periimplantitis. Clin Oral Implants Res 12: 104 -108.

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korblik M, Moan J, Peng Q (1998). Photodynamic Therapy. J Nat Canc Inst 90: 889 – 905.

Dubrez D (1989). Drugs in the periodontal pocket. A review of the literature. Schweizer Monatsschrift f. Zahnmedizin 99: 149 – 161.

Eick S, Pfister W and Straube E (1998). Antimicrobial Susceptibility of anaerobic and capnophilic bacteria isolated from odontogenous abscesses and rapidly progressive periodontitis. Antiinfect Drugs Chemother 16: 94.

Eick S, Pfister W, Korn S, Mägdefessel – Schmutzer U und Straube E (2000). Erreger – und Resistenzspektrum bei intraoralen Infektionen des Kiefer-Gesichtsbereiches unter besonderer Berücksichtigung der anaeroben Keimflora. Mund – Kiefer – Gesichts – Chir 4: 234 – 239.

Elter JR, Champagne CME, Offenbacher S, Beck JD (2004). Relationship of periodontal disease and tooth loss to prevalence of coronary heart disease. J Periodontol 75: 782-790.

Emingil G, Atila G, Sorsa T, Luoto H, Kirilmaz L, Baylas H (2004). The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. J Periodontol 75: 1378-1396.

Ferez M, Haffajee AD, Goncalves C, et al (1999). Systemic Doxycycline administration in the treatment of periodontal infections II. Antibiotic resistance of subgingival species. J Clin Periodontol 26: 784-792.

Flemming TF, Milian E, Karch H and Klaiber B (1998). Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring Actinobacillus actinomycetemcomitans and / or Porphyromonas gingivalis. J Clin Periodontol 25: 380 – 387.

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AO, Hamblin MR (2007). Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 39: 59 – 66.

Garcia RI, Nunn ME, Volkonas PS (2001). Epidemiologic associations between periodontal disease and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Periodontol*: 71-77.

Graves DT, Cochran D (2003). The contribution of Interleukin -1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. *J Periodontol* 74: 391 – 401.

Greenstein G (1992). Periodontal response to mechanical non – surgical therapy: a review. *J Periodontol* 63: 118 – 130.

Haas R, Dörtbudak O, Mensdorff – Pouilly N, Mailath G (1997). Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. *Clin. Oral Implants Res* 8: 249 – 254.

Haas R, Baron M, Dörtbudak O, Watzek G (2000). Lethal photosensitization, autogenous bone, and ePTFE membrane for the treatment of periimplantitis: preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15: 374 – 382.

Haffajee AD, Uzel NG, Arguello EI, Torresyap G, Guerrero DM, Socransky SS (2004). Clinical and microbiological changes associated with the use of combined antimicrobial therapies to treat “refractory” periodontitis. *J Clin Periodontol* 31: 869-877.

Hausmann W (1911). Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. *Biochem Zeit* 17: 276 – 316.

Hayek R, Ney SA, Gioso MA, Ferreira J, Baptista – Sobrinho CA, Yamada AM, Ribeiro MS (2005). Comparative Study Between the Effects of Photodynamic Therapy and Conventional Therapy on Microbial Reduction in Ligature Induced Peri – Implantitis in Dogs. J Periodontol 76: 1275 – 1281.

Henderson BW (1992). Photodynamic therapy: Basic principles and clinical applications. New York: Marcel Dekker.

Henry CA, Judy M, Dyer B, Wagner M, Matthews J (1995). Sensitivity of Porphyromonas and Prevotella species in liquid media to argon laser. Photochem Photobiol 61: 410 – 413.

Ishikawa I, Kawashima Y, Oda S, Iwata T and Arakawa S (2002). Three case reports of aggressive periodontitis associated with Porphyromonas gingivalis in younger patients. J Periodontal Res 37: 324-332.

Jorgensen MG, Aalam A, Slots J (2005). Periodontal antimicrobials – finding the right solutions. Int Dent J 55: 3 – 12.

Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D and Fine DH (2002). Population structure and genetic diversity of Actinobacillus actinomycetemcomitans strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. J Clin Microbiol 40: 1181-1187 In: Doll K, Angelus T. Vitalitätsverlust parodontopathogener Bakterien durch die Photodynamische Therapie. Dissertation. 2005

Kocher T, Schwahn C, Gesch D, Bernhardt O, Jahn K, Meisel P, Bachim V (2005). Risk determinants of periodontal disease – an Analysis of the study of Health in Pomerania (SHIP O). J Clin Periodontol 32: 59- 67.

Komerik N, Nahaniski H, Mac Robert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M (2003). In vivo killing of porphyromonas gingivalis by Toluidine blue – mediated photosensitization in an animal model. Antimicrob Agents Chemother 47: 932 – 940.

Konopka K ,Goslinski T (2007). Photodynamic therapy in dentistry. J Dent Res 86: 694 – 707.

Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, Kislinger T, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM (2000). Blockade of RAGE suppresses periodontitis – associated bone loss in diabetic mice. J Clin Invest 105: 1117- 1124.

Landthaler M, Rück A und Szeimies RM (1993). Photodynamische Therapie von Tumoren der Haut. Der Hautarzt 44: 69-74.

Laustriat G (1986). Molecular mechanism of photosensitization. Biochemie 68: 771 – 778.

Lindhe J, Nyman S (1987). Clinical trials in periodontal therapy. J Periodontol Res 22: 217 – 221.

Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E and Morrison EC (1985). Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J Periodontol 56: 447-456.

Loesche WJ, Grossman NS (2001). Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. Clin Microbiol Rev 14: 727 – 752.

Lopez R, Fernandez O, Jara G, Baelum V (2001). Epidemiology of clinical attachment loss in Chilean adolescents. J Periodontol 72: 1666 – 1672.

López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD (2006). Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. J Clin Periodontol 33: 648 – 660.

Malik Z, Hanania J, Nitzan Y (1990). New trends in photobiology (invited review) Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. J Photochem and Photobiol 5: 281 – 293.

Martin JA, Page RC, Kaye EK, Hamed MT, Loeb G (2009). Periodontitis severity plus risk as a tooth loss predictor. J Periodontol 80: 202-209.

Meisel P, Siegemund A, Grimm R, Hermann FH, Jahn U, Schwahn C & Kocher T (2003). The interleukin – 1 polymorphism, smoking and the risk of periodontal disease in the population – based SHIP study. J Dental Res 82: 189 – 193.

Meurman JH, Wahlfors J, Korhonen A, Alakuijala P, Torkko H & Janne J (1997). Identification of Bacteroides forsythus in Subgingival Dental Plaque with the Aid of a Rapid PCR Method. J Dent Res 76: 1376-1380.

Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives – Taylor PM (1991). Evidence for invasion of a human oral cell line by Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun 59: 2719 – 2726.

Moan J (1990). On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. Photochem Photobiol 6: 343 – 344.

Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP (1994). Actinobacillus actinomycetemcomitans in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment. J Periodontol 65: 820 – 826.

Müller HP, Eickholz P, Heinecke A, Pohl S, Müller RF, and Lange DE (1995). Simultaneous isolation of Actinobacillus actinomycetemcomitans from subgingival and extra crevicular locations of the mouth. J Clin Periodontol 22: 413 – 419.

Neugebauer J, Jozsa M, Kübler A (2004). Die antimikrobielle Photodynamische Therapie zur Prävention der alveolären Ostitis und des Dolor postextractionem. Mund Kiefer Gesichts Chir 8: 350 – 355.

Nishihara T, Koseki T (2004). Microbial ethiology of periodontitis. Periodontol 36: 14 – 26.

Nishimura F, Takahashi K, Kusikara M, Takashiba S, Murajama Y (1998). Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. Ann Periodontol 3: 20 – 29.

Novaes AB (Jr), Schwartz F, Humberto O, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC (2012). Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. Lasers in Medical Science 27: 389-395.

Ochsenbein H (1974). Chlorhexidine in der Zahnheilkunde – Aktueller Stand der Forschung. Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin 84: 459 – 468.

Oleinick NL, Evans HH (1998). The Photobiology of photodynamic therapy: Cellular targets and mechanisms. Radiat Res 150: 146 – 156.

Oosterwaal PJM, Milex FHM, van't Hof MA, Renggli HH (1991). Comparison of the antimicrobial effect of the application of chlorhexidine gel, amine fluoride gel and stannous fluoride gel in debrided periodontal pockets. J Clin Periodontol 18: 245 – 251.

Pass HI (1993). Photodynamic therapy in oncology: Mechanism and clinical use. J Nat Cancer Inst 85: 443 – 465.

Pfeiffer H (1911). Der Nachweis photodynamischer Wirkung fluoreszierender Stoffe am lebenden Warmblüter. In: Abderhaldan E(ed). Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Urban und Schwarzenberg. Berlin. pp. 563 – 571.

Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E (2004). Killing of Periodontopathogenic Bacteria by Photodynamic Therapy. J Periodontol 57: 1343 – 1349.

Plagmann HC (1998a). Lokale chemische Plaquebeeinflussung. In: Plagmann HC, Hrsg. Lehrbuch der Parodontologie. München, Wien; Hanser, 585 – 594.

Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G (2009). Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. J Clin Periodontol 36: 575 - 580.

Qadri T, Miranda L, Tuner J, Gustafsson A (2005). The short-term effect of low-level laser as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. J Clin Periodontol 32: 714 - 719.

Roberts MC (2002). Antibiotic toxicity, interaction and resistance development. Periodontol 28: 280 - 297.

Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Goene RJ, Abbas F and de Graaf J (1990). Occurrence of Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in severe periodontitis in relation to age and treatment history. J Clin Periodontol 17: 392 - 399.

Rodrigues RM, Goncalves C, Souto R, Feres – Filho EJ, Uzeda M, Colombo AP (2004). Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. J Clin Periodontol 31: 420 – 427.

Sanz M, Neumann MG, Anderson L, Matoska W, Otomo – Corgel J, Saltini C (1989). Clinical enhancement of postperiodontal surgical therapy by a 0,12% chlorhexidine gluconate mouthrinse. J Periodontol 60: 570 – 576.

Sbordone L, Bortolaia C (2003). Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. Clin Oral Investig 7: 181–189.

Schopfer P, Brennicke (1999). Pflanzenphysiologie. 5. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio. Springer – Verlag.

Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ (2003). Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligatur – induced peri – implantitis: a preliminary study in dogs. J Oral Sci 45: 17 – 23.

Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH, Marcantonio E (2006). Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of periimplantitis: an experimental study in dogs. Clin Oral Implants Res 17: 273 – 281.

Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ (2000). Photodynamic Therapy: A new concept in medical treatment. Braz. J Med Biol Res 33: 869 – 880.

Sigusch BW, Müller B, Klinger G und Glockmann E (2000). Die Effizienz der Wurzelglättung beeinflusst das Ergebnis der Antibiotikatherapie bei marginaler Parodontitis. Dtsch Zahnärztl. Z55: 294 – 297.

Sigusch BW, Beier M, Klinger G, Pfister W, Glockmann E (2001). A 2 – step non – surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. J Periodontol 72: 275 – 283.

Sigusch BW, Güntsch A, Pfitzner A, Glockmann E (2005). Enhanced root planing and systemic metronidazole administration improve clinical and microbiological outcomes in a two- step treatment procedure. J Periodontol 76: 991 – 997.

Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E (2005). Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. J Periodontol 76: 110-1105.

Sigusch BW, Wutzler A, Nietzsche T, Glockmann E (2006). Evidence for a specific crevicular lymphocyte profile in aggressive periodontitis. J Periodont Res 41: 391 - 396.

Sigusch BW, Völpe A, Pfister W (2007). Efficacy of photodynamic therapy on clinical signs of inflammation of the periodontium and the detection of periodontopathogenic bacteria species. A case report. Parodontologie 18: 229 - 238.

Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpe A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J (2010). Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy (PDT) in F.nucleatum infected periodontitis patients. J Periodontol 81: 975 - 981.

Slots J, Bragd L, Wikström M and Dahlen G (1986). The occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodontol 13: 570 – 577.

Slots J, Rams TE (1992). Microbiology of periodontal disease. In: Slots J. Tautman M. Contemporary oral microbiology and immunology. St Louis, Mosby 425 – 443.

Slots J, Jorgensen MG (2002). Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy ; where are we going, and are we there yet? Periodontol 28: 298 – 312.

Slots J (2002). Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. J Periodont Res 37: 389 – 398.

Soukos NS, Ximenez – Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. (1998). Targeted Antimicrobial Photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2595 – 2601.

Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG (2003). Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med* 33: 161 – 168.

Stohrer WD (1998). Die konzeptionellen und theoretischen Grundlagen der Photochemie. In: Wöhrle D, Tausch MW, Hrsg. Photochemie: Konzepte, Methoden, Experimente. Weinheim, Berlin, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley – VCH, 5 – 81.

Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA and Socransky SS (1979). A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 6: 278 - 301.

Takanashi K, Kishi M, Okuda K, Ishihara K (2004). Colonization by porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia from teeth to osseointegrated implant regions. *Bull Tokyo Dent Coll* 45: 77–85

Van der Velden U, Schoo WH (1999). Wissenschaftliche Grundlagen der Parodontalbehandlung. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, Hrsg. klinische Parodontologie und Implantologie. Berlin, Chicago, London, Paris, Tokio, Barcelona, Sao Paulo, Moskau, Prag, Sofia, Warschau; Quintessenz – Verlag , 794 – 821.

Van Winkelhoff AJ, Herrera Gonzales D, Winkel EG, Delleijm – Kippuw N, Vandenbroche Grands CMJE, Sanz M (2000). Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 27: 79 – 86.

Van Winkelhoff AJ, Loos BG, Van Der Reijden WA and Van Der Velden U (2002). Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol 29: 1023 - 1028.

Von Tappeiner H, Jesionek A (1903). Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Münch. Med. Wochenschr. 47: 2042 – 2044.

Von Tappeiner H, Jodlbauer A (1907). Die sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen über die photodyn. Erscheinung. FCW Vogel. Leipzig.

Wainwright M (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Antimicrob Chem 42: 13 – 28.

Wainwright M, Crossley KB (2004). Photosensitizing agents – circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. Int Biodet Biodeg 53: 119 – 126.

Walker C, Karpini K (2002). Rationale for use of antibiotics in periodontics. J Periodontol 73: 1188 – 1196.

Walker CB (1996). The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. Periodontol 10: 79 – 88.

Weber T (1997). Parodontologie. In: Weber T (ed): Memorix Zahnmedizin, 1. Auflage, Chapman & Hall GmbH, Weinheim 279 – 282.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ (2006). Antibacterial action of photoactivated disinfection (PAD) used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. J Dent 34: 363 – 371.

Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ (1995). Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low power laser light in the presence of a photosensitizer. J Appl Bacteriol 78: 569 – 574.

Wöhrle D (1998a). Photochemie im sichtbaren Bereich, solare Photochemie und verwandte Prozesse. In: Wöhrle D, Tausch MW, Stohrer WD, Hrsg. Photochemie: Konzepte, Methoden, Experimente. Weinheim, Berlin, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley – VCH, 113 – 178.

Wu CD, Savitt ED (2002). Evaluation of the safety and efficacy of over – the – counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. Periodontol 28: 91 – 105.

13 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Hr. Prof. Dr. Dr. B. W. Sigusch, Fr. OÄ. R. Montag, Fr. Dipl. Ing. A. Völpel, Fr. Prof. J. Schütze, Hr. Dr. Lehmann,

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe, und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

14 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof Dr. Dr. B. W. Sigusch für die Überlassung des Themas und die wertvollen Vorschläge zur Dissertation sowie für die anregenden Diskussionen und die vielfältigen Hinweise während der Bearbeitung des Themas.

Frau OÄ Dr. R. Montag gebührt mein Dank für Ihr offenes Ohr und Ihre fachliche Unterstützung.

Besonderer Dank gilt den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen Frau Dipl. Ing. A. Völpel und Frau S. Tonndorf-Martini für Ihre fachliche Unterstützung und auch für die Art, wie Sie mir auch in schwierigen Situationen immer freundlich und menschlich zur Seite standen.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Firma biolitec AG Jena bedanken.

Ich bedanke mich auch bei Frau Prof. J. Schütze und Herrn Dr. Lehmann speziell für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Zuletzt bin ich meinen Eltern sehr dankbar, ohne deren liebevolle Unterstützung das Studium der Zahnmedizin und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.